



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia
Laboratório de Imunologia Aplicada
Florianópolis, SC, Brasil



CARACTERIZAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA DE DIFERENTES LINHAGENS DE PLASMOCITOMAS MURINOS UTILIZADAS NA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS

Elis Amaral Rosa

Florianópolis, dezembro de 2009.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA
LABORATÓRIO DE IMUNOLOGIA APLICADA

**CARACTERIZAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA DE DIFERENTES LINHAGENS
DE PLASMOCITOMAS MURINO UTILIZADAS
NA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS**

ELIS AMARAL ROSA

Trabalho apresentado como requisito para
o cumprimento da disciplina Estágio II
(BIO 5156) do Curso de Graduação em
Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Santa Catarina.

Orientador: Prof. Dr. Aguinaldo R. Pinto

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos R. Zanetti

Florianópolis, dezembro de 2009.

Agradecimentos

Agradecer por este trabalho significa muito mais que agradecer por um projeto de pesquisa. É agradecer pela conclusão de uma etapa importantíssima da minha vida. E me deu uma alegria muito grande quando notei que seria difícil nomear a todos que foram importantes nessa caminhada, pois realmente foram muitas as pessoas que contribuíram para que eu chegasse até aqui. Sei que cada um de vocês sabe o quanto lhes quero bem. Então, gostaria de citar algumas pessoas que me acompanharam nestes últimos anos de graduação.

E assim deixo aqui registrado meus agradecimentos mais sinceros,

ao Prof. Dr. Aguinaldo Roberto Pinto, pela oportunidade de desenvolver meu trabalho de conclusão de curso no LIA, pela orientação nesse trabalho, pela atenção, paciência e tempo dedicadas a ele, e por contribuir imensamente para o meu desenvolvimento científico e para o crescimento do meu fascínio pela imunologia;

ao Prof. Dr. Carlos Roberto Zanetti, pela co-orientação neste trabalho, pelas grandes contribuições imunológicas e astrológicas e por chacoalhar muitas vezes a minha maneira de ver a ciência e a vida;

a MSc. Sílvia Lanza (Guilda!), por me ensinar a diferença entre ratos e camundongos, por me introduzir no vício da citometria de fluxo e na cultura da “jararaginissee”, por compartilhar de todas as minhas alegrias e frustrações deste meu conturbado último ano de curso, pela eterna companhia laboratorial e virtual, pelo ombro e pela contribuição essencial para a construção deste TCC;

aos meus amigos do LIA: Jonatan (por me ensinar a miraculosa arte da cultura de células!), Nana (amiga do LIA, da Cito, de Casa, e de tantos e tantos outros momentos), Carol (minha inspiração para as atividades extremamente matutinas), Mila (pela eterna disposição em tirar minhas dúvidas imunológicas/laboratoriais), Gi (especialista em baladas e retiradas de sangue!), Douglas (por aumentar enormemente meu conhecimento sobre a década de 80), Álvaro (companheiro de conversas de RU e caronas para Joinville), Thiago (titular na trilha sonora das confraternizações do laboratório), Fernando (sempre disposto a uma conversa filosófica a beira do fluxo), Luan e Yuri (os garotos sorriso do LIA), meu obrigado por tornar as horas na bancada menos penosas;

ao grupo PET-Biologia responsável por uma parte muito importante da minha formação, agradeço aos velhos companheiros petianos, aos eternos companheiros petianos e aos herdeiros do PET-Bio, por tudo que representou compartilhar grande parte da minha graduação com vocês

e em especial a profa. Dra. Tânia T. Castellani, que sempre representou para mim muito mais do que uma tutora;

a meus amigos biólogos Fabi, Kauê, Ricardo e Ronan, por me permitirem compartilhar de momentos incríveis e por serem meus eternos anjos;

aos meus amigos quase biólogos (que são muitos!), em especial a meus amigos de turma Kenny, Japa, Alê, Andrezinho, Jonatan, Dai, Clara, Elaine, Zucco, Lari, Suelen, Lu, Pri (que já é bióloga, mas falta licenciatura!), Nana, Tice e May, e minhas amigas de turma “postiça”, Kika, Gabi, Fêrr, Mel, Mah, Ju, Luli, Mari, e todos aqueles que estiveram comigo ao longo desses anos de graduação, meu muito obrigada por todas as lembranças maravilhosas que vocês significam na minha vida;

a minhas amigas compartilhadoras de casa, Luli e Malu, com as quais passei situações difíceis e que mais do que ninguém compartilharam das minhas tensões pré-TCC e contribuíram muito para que mesmo nas horas mais complicadas eu não deixasse de sorrir;

a minhas amigas de sempre, Rafa, Ana e Poli que são as irmãs que eu não tive;

a minha mãe, meu pai e meu irmão, por tudo que significam para mim, por serem meu alicerce e a razão do meu esforço para chegar até aqui, vocês são as pessoas mais importantes da minha vida.

“Eu não posso ser menor que os meus sonhos...”

RESUMO

Anticorpos monoclonais são importantes reagentes utilizados na pesquisa biomédica, em testes de diagnóstico, bem como no tratamento de enfermidades. Sua produção em larga escala foi possível através da metodologia proposta por Kohler & Milstein que consiste na fusão de linfócitos B de camundongos imunizados com células de linhagem de plasmocitoma murino não produtores de imunoglobulinas. Essa fusão dá origem a células secretoras conhecidas como hibridomas que são os responsáveis pela produção de anticorpos monoclonais. Dentre as linhagens de plasmocitoma atualmente utilizadas para produção de anticorpos monoclonais estão P3X63Ag8.653, SP2/0-Ag14 e NS1. Apesar de estabelecidas há muito tempo, pouco se conhece sobre estas linhagens celulares. Este trabalho teve como objetivo caracterizar estas linhagens celulares através do perfil de marcadores expressos na superfície celular identificados através de citometria de fluxo. Foi utilizado um painel de anticorpos dirigidos contra as proteínas de superfície CD19, CD21/CD35, CD22.2, CD23, CD25, CD30, CD38, CD40, CD45/B220, CD69, CD72, CD79b, CD80, CD117, CD138, CD154 e CD184. As análises dos padrões de tamanho (FSC) e complexidade celular interna (SSC) revelaram a existência de uma população de menor tamanho (população 1) e outra de tamanho maior (população 2). As moléculas CD23, CD30, CD117 e CD154 não foram expressas em nenhuma das linhagens avaliadas. A linhagem P3X63Ag8.653 apresentou expressão em ambas subpopulações dos marcadores CD40, CD80, CD184 e CD138, enquanto que os marcadores CD45/B220 e CD25 foram expressos apenas na subpopulação 1. A linhagem SP2/0-Ag14 apresentou expressão em ambas as subpopulações dos marcadores CD40, CD80, CD72, CD22, CD79b, CD184 e CD138, enquanto que as moléculas CD45/B220 e CD25 foram expressos apenas na subpopulação 1. As linhagens SP2/0-Ag14 e P3X63Ag8.653 apresentaram maior similaridade no perfil imunofenotípico entre si em comparação com a linhagem NS1. Os marcadores expressos em ambas as subpopulações de NS1 foram CD79b, CD80, CD138, CD184, CD38 e CD45/B220, enquanto que as moléculas expressas apenas na subpopulação 2 foram CD19, CD22, CD72 e CD69, sendo CD25 observado apenas na subpopulação 1. As mesmas análises foram realizadas nas linhagens de hibridomas 46C e 9C7. O perfil de expressão de marcadores celulares nas linhagens de hibridomas avaliados foi similar ao encontrado na linhagem celular P3X63Ag8.653 (da qual ambos são derivados), sendo a alta expressão de CD38 a diferença mais significativa. Os resultados obtidos no presente trabalho contribuem para aumentar o conhecimento sobre as linhagens celulares P3X63Ag8.653, SP2/0-Ag14 e NS1. A partir do estabelecimento de marcadores específicos para essas células abrem-se novas possibilidades de estudo de sua biologia, tanto no campo da ciência básica como na aplicada.

Palavras chave: anticorpos monoclonais, imunofenotipagem, plasmocitomas murinos.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Moléculas de superfície preferencialmente expressas em linfócitos B.	17
Tabela 2: Painel de anticorpos monoclonais utilizados na caracterização das linhagens celulares avaliadas.	25
Tabela 3: Concentrações dos anticorpos monoclonais utilizados na marcação celular das linhagens celulares.	27
Tabela 4: Valores médios de FSC e SSC das subpopulações observadas nas diferentes linhagens avaliadas.	29
Tabela 5: Critérios de agrupamento dos anticorpos utilizados para a realização de imunofenotipagem das linhagens celulares P3X63Ag8.653, SP2/0-Ag14, NS1, 46C e 9C7.	30
Tabela 6: Marcadores celulares avaliados nas três linhagens de plasmocitoma murinos e nas duas linhagens de hibridomas.	45

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1: Visão geral do processo de produção de anticorpos monoclonais. Adaptado de Abbas <i>et al.</i> , 2008.	13
Fig. 2: Expressão de diferentes marcadores de superfície na ontogênese do linfócito B. Adaptado de Burmester & Pezzuto, 2003.	16
Fig. 3: Esquema geral dos processos utilizados para o isolamento de diferentes linhagens de plasmocitomas murinos não secretores.	21
Fig. 4: Análise dos padrões de FSC das linhagens avaliadas neste estudo.	28
Fig 6: Avaliação da expressão das moléculas de ativação acessórias do complexo BCR nos plasmocitomas murinos analisados (CD19 e CD21.35).	31
Fig 7: Avaliação da expressão das moléculas de ativação acessórias do complexo BCR nos plasmocitomas murinos analisados (CD79b).	32
Fig.9 : Avaliação da expressão das moléculas de regulação acessórias do complexo BCR nos plasmocitomas murinos analisados (CD22).	34
Fig. 9 : Avaliação da expressão das moléculas de regulação acessórias do complexo BCR nos plasmocitomas murinos analisados (CD72).	35
Fig. 10: Avaliação da expressão de moléculas de ativação nos plasmocitomas murinos analisados.	36
Fig. 11: Avaliação da expressão das moléculas de interação com linfócito T nos plasmocitomas murinos analisados (CD40).	38
Fig. 12: Avaliação da expressão das moléculas de interação com linfócito T nos plasmocitomas murinos analisados (CD80).	39
Fig. 13: Avaliação da expressão de marcadores de plasmócitos nos plasmocitomas murinos analisados (CD138).	41
Fig. 14: Avaliação da expressão de marcadores de plasmócitos nos plasmocitomas murinos analisados (CD38).	42
Fig. 15: Avaliação da expressão de marcadores de plasmócitos nos plasmocitomas murinos analisados (CD184 e CD45/B220).	43

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS	7
LISTA DE FIGURAS	8
1. INTRODUÇÃO	11
1.1 Anticorpos Monoclonais	12
1.2 Linfócitos B e seus marcadores de superfície	14
1.3 Plasmócitos anômalos: Mieloma e Plasmocitoma	19
1.3.1 Linhagens Celulares de Plasmocitoma Murino	20
2. JUSTIFICATIVA	22
3. OBJETIVOS	23
3.1 Objetivos específicos	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1 Linhagens celulares	24
4.2 Marcação da superfície celular	24
4.3 Padronização dos valores de detecção, aquisição das amostras e estratégia de gates	26
4.4 Cálculo dos valores de intensidade média de fluorescência dos marcadores	26
5. RESULTADOS	27
5.1 Determinação dos valores de concentração dos anticorpos utilizados	27
5.1 Determinação dos padrões de SCC e FSC das linhagens celulares avaliadas	28
5.2 Imunofenotipagem das linhagens celulares P3X63Ag8.653, SP2/0-Ag14 e NS1.	30
5.2.1 – Expressão de moléculas de ativação acessórias do complexo BCR.	30
5.2.2 – Expressão de moléculas de regulação acessórias do complexo BCR	33
5.2.3 – Expressão de moléculas de ativação celular	35
5.2.4 – Expressão de moléculas co-estimulatórias de interação com Linfócito B	37
5.2.5 – Expressão de moléculas características de plasmócitos	40
5.3 Imunofenotipagem dos hibridomas 46C e 9C7	44
6 – DISCUSSÃO	46

7. CONCLUSÕES	52
8. REFERÊNCIAS	53

1. Introdução

O termo “culturas celulares” é utilizado para designar células mantidas *in vitro*, não estando mais organizadas em tecidos e crescendo isoladas em ambiente estéril. A partir do cultivo inicial dessas células, originárias diretamente de um órgão, obtém-se uma cultura primária que, após sua imortalização, isto é, aquisição da capacidade de se multiplicar indefinidamente, torna-se uma linhagem celular contínua (BARROS *et al.*, 2008).

Uma cultura primária pode ser originada de duas formas: através da migração celular ocorrida de um fragmento de tecido isolado ou por meio da dissociação tecidual direta, que pode ser realizada de forma mecânica ou enzimática. O estabelecimento da cultura primária é a primeira etapa de vários processos de seleção empregados na obtenção de uma linhagem celular, uma vez que apenas as células sobreviventes ao processo de isolamento permanecerão em cultura. É possível estreitar esse processo de seleção submetendo a cultura a condições particulares, como diferentes suplementações do meio (PHELAN, 2007).

Depois de atingido um determinado nível de proliferação celular desta cultura primária, se faz necessária a realização de uma subcultura, processo também conhecido como “passagem”. Essa denominação se refere ao procedimento de repassar parte destas células do recipiente estéril em que se encontram para um novo recipiente (RICARDO & PHELAN, 2008). No decorrer de sucessivas passagens, as células começam a se adaptar melhor ao ambiente *in vitro*. Por meio de alterações genéticas, estas células adquirem estabilidade e capacidade de se multiplicar indefinidamente, podendo então receber a denominação de linhagem celular (FRESHNEY, 2005).

Linhagens de células podem ser propagadas como uma monocamada aderente ou em suspensão. A monocamada aderente é o modo de cultura comum para a maioria das células normais. Culturas em suspensão são derivadas de células que podem sobreviver e se multiplicar sem necessidade de fixação ao substrato, sendo esta capacidade restrita a células hematopoiéticas, linhagens celulares transformadas e células de tumores malignos (RICARDO & PHELAN, 2008).

As culturas celulares são utilizadas em várias áreas de pesquisa, sendo que as linhagens celulares contínuas apresentam um melhor crescimento em cultura e maior estabilidade genotípica e fenotípica em comparação as culturas primárias. Esta soma de fatores faz com que as linhagens celulares proporcionem melhor possibilidade de padronização de diferentes técnicas, quando comparadas às culturas primárias (SILVA *et al.*, 2001).

Após o estabelecimento de uma linhagem celular imortalizada se faz necessária sua caracterização detalhada (MITSUTAKE *et al.*, 2006), a fim de identificar características específicas desse grupo celular que possam indicar futuras aplicações científicas do mesmo. Os

métodos comumente utilizados para a caracterização celular são a análise citogenética, análise do citoesqueleto, perfil de DNA (MITSUTAKE *et al.*, 2007) e análise de antígenos de superfície, sendo este último o mais utilizado para linhagens hematopoiéticas (SIRONI *et al.*, 2006).

Dentre as principais aplicações das linhagens celulares destacam-se seu uso no diagnóstico de infecções causadas por vírus através do isolamento e posterior identificação desses agentes (LELAND & GINOCCHIO, 2007), na produção de vacinas e de reagentes imunobiológicos (PETRICCIANI & SHEETS, 2008), testes para avaliação da toxicidade de biomateriais (PRESTWICH, 2008) e, em especial, na produção de anticorpos (SHULMAN *et al.*, 1978). O estabelecimento de linhagens celulares capazes de secretar imunoglobulinas *in vitro* foi fundamental para o sucesso e difusão mundial da técnica de produção dos chamados anticorpos monoclonais.

1.1 Anticorpos Monoclonais

Anticorpos são importantes ferramentas utilizadas na pesquisa biomédica, em testes de diagnóstico, bem como no tratamento de doenças infecciosas e câncer (WATKINS & OUWEHAND, 2000). No entanto, inicialmente seu uso era limitado devido à impossibilidade de serem produzidos em larga escala (NACIONAL ACADEMY PRESS, 1999). Na década de 70, Kohler & Milstein (1975), desenvolveram uma metodologia que resultou na técnica de seleção de anticorpos com especificidade definida em forma clonal, denominados anticorpos monoclonais. Esse método possibilitou a produção de quantidades praticamente ilimitadas de moléculas de anticorpos específicos contra um determinado antígeno, revolucionando a imunologia (BIRCH & RACHER, 2006).

A metodologia de geração de hibridomas descrita por Kohler & Milstein (1975) consiste na imunização de camundongos, posterior remoção do baço, recuperação de linfócitos B e fusão destes com uma linhagem de plasmocitoma murino. A seguir é realizada uma seleção de modo a isolar células resultantes da fusão entre um linfócito B e uma célula de linhagem de plasmocitoma murino, denominadas hibridomas. Posteriormente é efetuada a expansão e identificação de hibridomas produtores de anticorpos de especificidade desejada (WATKINS & OUWEHAND, 2000). Um resumo deste processo pode ser observado na Figura 1.

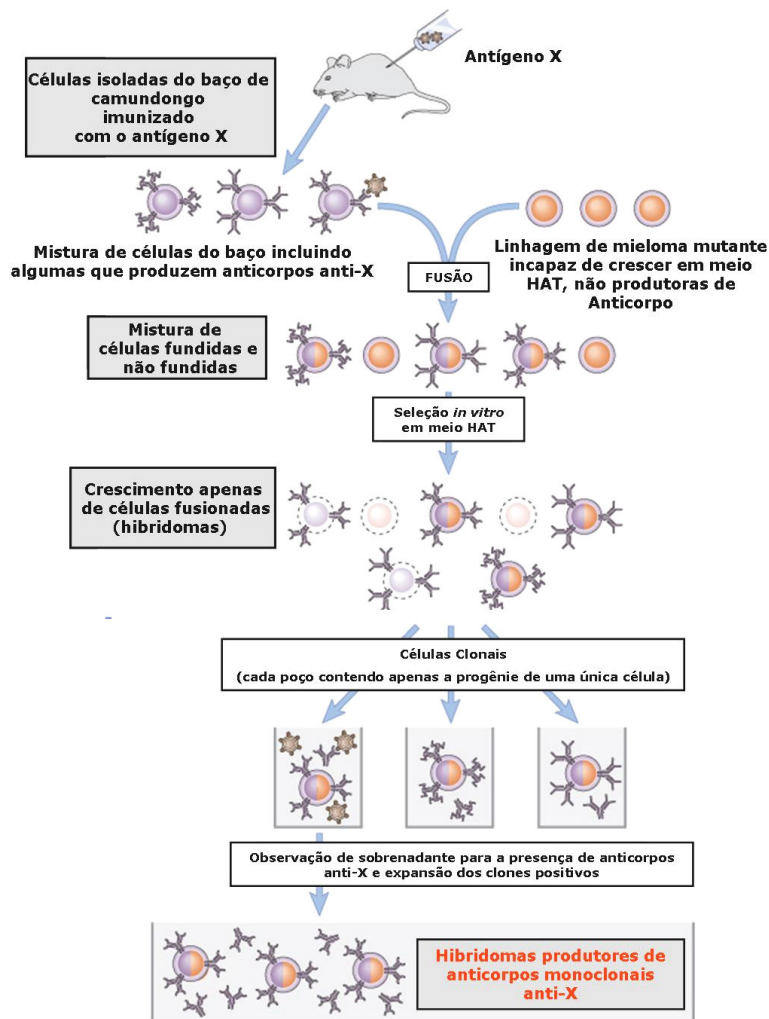


Fig. 1: Visão geral do processo de produção de anticorpos monoclonais. Adaptado de Abbas *et al.*, 2008.

Algumas linhagens de plasmocitomas murinos são incapazes de produzir imunoglobulinas, sendo por este motivo especialmente indicadas para o processo de fusão celular (SHULMAN *et al.*, 1978). Entretanto, após a fusão celular, a cultura resultante apresenta plasmócitos e células de linhagem não fundidas, assim como fundidas de maneira não desejada. Com intuito de selecionar apenas células de interesse é utilizado um meio de cultura específico, deficiente em determinados compostos, chamado de meio de seleção ou meio HAT. Esplenócitos não fundidos não tem a capacidade de crescimento em cultura, enquanto que as linhagens de plasmocitomas selecionadas para produção de anticorpos monoclonais não proliferam nesse meio, pois perdem a capacidade de síntese de DNA. Porém, quando esplenócitos normais fundem-se às células de plasmocitoma, poderão tornar-se células capazes de reprodução indefinida em cultura, possuidoras das enzimas necessárias para o crescimento em meio HAT, sendo chamados de hibridomas (KOHLER & MILSTEIN, 1975).

Células animais normais sintetizam nucleotídeos de purina e timidilato, ambos precursores do DNA, pela via *de novo* que requer tetraidrofolato. Fármacos antifólicos, como a aminopterina, bloqueiam a ativação do tetraidrofolato, inibindo a síntese de purinas e, consequentemente, de DNA pela via *de novo*. Células tratadas pela aminopterina podem usar uma via de recuperação na qual a purina é sintetizada de hipoxantina exógena, por meio da enzima hipoxantina fosforibosil transferase (HPRT), sendo o timidilato sintetizado a partir da timidina pela enzima timidina quinase (TK) (JANEWAY *et al.*, 2005). Assim, o crescimento celular ocorrerá na presença de aminopterina apenas se o meio de cultura também for suplementado com hipoxantina e timidina, chamado meio HAT. As células de mieloma podem tornar-se defeituosas em HPRT ou TK mediante mutagênese seguida de seleção em um meio que contenha substratos para essas enzimas que levem à produção de substâncias letais. Somente células deficientes em HPRT ou TK sobrevivem nessas condições. As células de mieloma que não possuem HPRT ou TK não podem usar a via de recuperação, morrerão no meio HAT. Se células B normais forem fundidas às células que não possuem essas enzimas, fornecerão as enzimas necessárias para que os híbridos sintetizem DNA (KOHLER & MILSTEIN, 1975).

Atualmente muitos pesquisadores trabalham com produção de anticorpos monoclonais baseados na metodologia proposta por Kohler e Milstein. Entretanto, existem grupos que tem proposto modificações nesta técnica. Seus principais objetivos são a otimização do processo (produção de anticorpos monoclonais em larga escala, diminuição dos custos e do tempo empregado nesse processo, entre outros) e a produção de anticorpos humanizados para fins terapêuticos. Essas alterações no método de obtenção de anticorpos monoclonais foram possíveis a partir do conhecimento da estrutura molecular dos anticorpos e da biologia do linfócito B (PRICE *et al.*, 2009).

1.2 Linfócitos B e seus marcadores de superfície

Os linfócitos B são células que expressam receptores de superfície capazes de identificar diferentes antígenos. Esse reconhecimento é realizado por meio das imunoglobulinas, também denominadas anticorpos, que além de estarem acopladas a membrana celular, podem também ser secretadas e ter ação protetora contra microorganismos e toxinas. O nome linfócito B é derivado da bursa de Fabricius, órgão de maturação das células B nas aves e no qual esse tipo celular foi primeiramente identificado. Nos mamíferos, a ontogênese e maturação dos linfócitos B ocorrem na medula óssea (TUCKER & LEBIEN, 2008).

A maturação dos linfócitos é constituída de um processo proliferativo que ocorre nos compartimentos especializados do sistema imune. Os principais eventos durante a maturação dos linfócitos B são rearranjos gênicos e a expressão dos genes das imunoglobulinas em uma ordem precisa, seguida da proliferação das células imaturas e seleção do repertório maduro resultando em diferentes fenótipos celulares (HARDY *et al.*, 2007). Ao adquirirem suas características funcionais, as células entram na circulação sanguínea e nos tecidos linfóides periféricos ou secundários, preparadas para responder à estimulação antigênica (BLOOM & SPITS, 2006).

É possível identificar diferentes estágios no decorrer da maturação do linfócito B (Figura 2), sendo estes estágios definidos pela expressão de diferentes marcadores de superfície (TUCKER & LEBIEN, 2008). As células B se desenvolvem a partir de células tronco hematopoiéticas, que passam a seguir um caminho de maturação voltado à linhagem B em resposta à ação de diferentes citocinas e à interação com outras células no ambiente da medula óssea (BLOOM & SPITS, 2006). A primeira célula da linhagem B claramente distinguível é chamada pró-B, que ainda não produz nenhuma imunoglobulina, mas já apresenta marcadores específicos de linhagem B, como CD19. Em seguida esta célula diferencia-se em uma célula denominada pré-B, que já passou por rearranjos gênicos, sendo capaz de expressar uma cadeia μ chamada de cadeia leve substituta, juntamente com moléculas transmembranas associadas (CD79a e CD79b), que formam um conjunto conhecido como receptor da célula pré-B (pré-BCR). A expressão deste conjunto pré-BCR garante que a célula passe por uma seleção positiva a fim de se tornar uma célula B madura (BARTHOLDY & MATTHIAS, 2004).

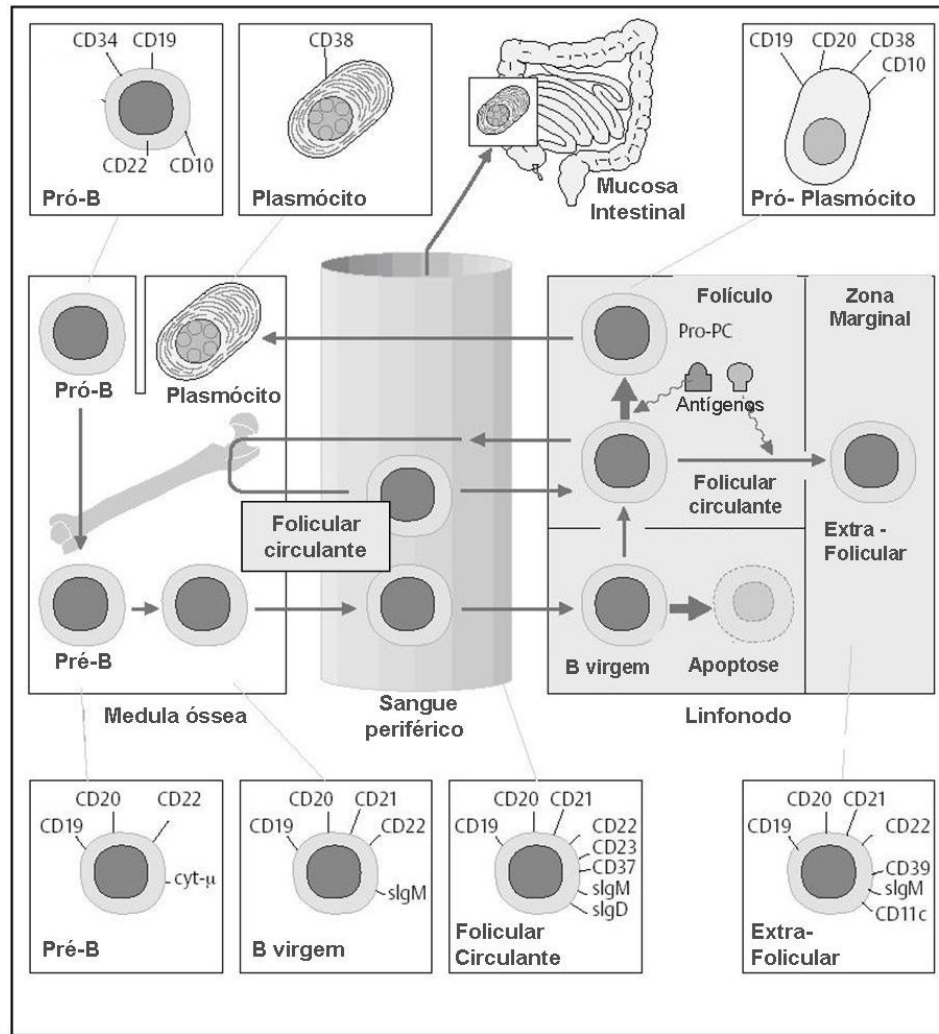


Fig. 2: Expressão de diferentes marcadores de superfície na ontogênese do linfócito B. Adaptado de Burmester & Pezzuto, 2003.

No próximo estágio, a célula passa a ser chamada de célula B virgem, porque apesar de expressar imunoglobulina IgM completa, ainda não entrou em contato com o antígeno. Na medula óssea ocorre um processo de seleção no qual os linfócitos B auto-reativos são induzidos a entrar em apoptose e apenas as células que sobreviverem a esse processo entram na circulação sanguínea e migram para os órgãos linfáticos secundários, onde terão contato com estímulos de célula T. As células que não forem capazes de receber esses estímulos também morrem por apoptose (TUCKER & LEBIEN, 2008). As sobreviventes deste processo passam a receber a denominação de células B foliculares, podendo ser foliculares circulantes, quando retornam para a corrente sanguínea, normalmente se estabelecendo em uma zona rica em células T (como as mucosas), ou extra-foliculares, quando permanecem na zona marginal dos linfonodos. Neste estágio as células já podem ser consideradas maduras, pois expressam IgM e IgD. O linfócito B chega ao seu ápice de maturação quando encontra um antígeno, se transformando em um pró-plasmócito, que mediante estímulos de citocinas adquire a capacidade de sintetizar

imunoglobulinas de isotipo diferente de IgM, se transformando em uma célula secretora de imunoglobulina, chamada de plasmócito (CASOLA, 2007).

O termo plasmócito descreve células que já não estão mais em ciclo celular, com grande capacidade secretora e extenso retículo endoplasmático. Sua migração é coordenada pela ação de citocinas que agem nessa população através de receptores de quimiocinas (CXC). Em células no final do processo de amadurecimento, os receptores CXCR5 e CCR7 deixam de ser expressos, o que se acredita ser um sinal para que os plasmócitos deixem os centros germinais. Em contrapartida, CXCR4 (CD184) e, na presença de INF- γ , CXCR3, aumentam sua expressão, induzindo a migração de plasmócitos dos linfonodos para a medula óssea e tecidos inflamados (TARLINTON, 2008).

As diferentes proteínas encontradas na membrana plasmática das células B podem ser utilizadas como marcadores fenotípicos para distinguir funcionalmente as distintas populações destes linfócitos. Buscando uma designação comum, na década de 80, estas proteínas de superfície passaram a ser chamadas “clusters of differentiation” (CD). Esta nomenclatura foi sancionada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) após uma série de encontros internacionais sobre o tema, sendo aceita universalmente (TUCKER & LEBIEN, 2008). Atualmente, agrupamentos de CDs são utilizados para realizar a imunofenotipagem de células de origem leucocitária. Essa identificação é realizada por meio de anticorpos contra antígenos específicos expressos por estas células. Tal técnica mostra-se relevante em estudos imunológicos, bem como em diagnóstico de neoplasias hematológicas (KALEEM, 2006). Estes antígenos são, em geral, proteínas funcionais de membrana, envolvidas na comunicação celular, adesão ou metabolismo (STEWART & STEWART, 1995). Atualmente, cerca de 10 moléculas expressas preferencialmente na superfície de linfócitos B são conhecidas (Tabela 1) (TUCKER & LEBIEN, 2008).

Tabela 1: Moléculas de superfície preferencialmente expressas em linfócitos B. Adaptado de (TUCKER & LEBIEN (2008).

Molécula	Nome Original	Função em linfócitos B	Estrutura
CD19	B4	Marcador Pan-B	Superfamília Ig
CD20	B1	Células B maduras	Família MS4A
CD21	B2, HB-5	Células B maduras	Receptor de complemento
CD22	BL-CAM, Lyb-8	Células B maduras	Superfamília Ig
CD23	FCeRII	Células B ativadas	Lectina tipo C
CD24	BA-1, HB6	Marcador Pan-B	Ancorador de GPI
CD40	Bp50	Células B em geral	Receptor de TNF
CD72	Lyb-2	Marcador Pan-B	Lectina tipo C
CD79a,b	Ig α , Ig β	Células B maduras	Superfamília Ig

A molécula CD19, juntamente com a molécula CD21 e CD81, forma o co-receptor que modula a transdução de sinal do complexo de receptor de antígeno de linfócito B (BCR), sendo reconhecido como um marcador pan-B (encontrado na maioria das fases de maturação das células de linhagem B) (BLOOM & SPLITS, 2006). Já CD22 induz a regulação negativa na transdução de sinal do complexo BCR, enquanto CD23 atua como receptor da porção Fc de IgE, estando presente em células B ativadas (CASOLA, 2007). CD40 e CD80 são receptores expressos principalmente por células B, apesar encontrados também em outros tipos celulares, sendo moléculas importantes para a sobrevivência destas células, atuando como umas das responsáveis por responder aos estímulos de linfócitos T CD4⁺ (BARTHOLDY & MATTHIAS, 2004). CD72 é um co-receptor de células B expresso em todas as fases do desenvolvimento, exceto em plasmócitos. Atua como co-ligante de BCR, podendo estabelecer sinalização positiva ou negativa (WU & BONDADA, 2002). CD79a e CD79b contém domínios citoplasmáticos altamente conservados, que se apresentam como motivos para fosforilação por uma tirosina quinase, sendo essenciais para dar início à sinalização do BCR e consequente ativação de linfócitos B (TUCKER & LEBIEN, 2008).

Moléculas de superfície, incluindo o CD71 (receptor de transferrina), CD98 (4F2) e CD69, são expressas por uma ampla gama de tipos celulares ativados (LAI *et al.*, 1998). A molécula CD69 é frequentemente utilizada como marcador de ativação celular. Trata-se de um antígeno de diferenciação expresso rapidamente após ativação de linfócitos T e B e outras células de origem hematopoiéticas, incluindo células NK (ZIEGLERAA *et al.*, 1994).

Paralelamente à nomenclatura CD, definiu-se a nomenclatura “Lymphocyte Ag” (Ly) para células de camundongos. Dessa forma, fez-se necessário o estabelecimento de uma co-relação entre as moléculas caracterizadas pelos dois sistemas. O Comitê para Padronização de Nomenclatura Genética para Camundongos tem atribuído designações CDs para diferentes antígenos murinos. Quando, após múltiplos estudos, um antígeno Ly é identificado como homólogo ao antígeno humano, o mesmo é renomeado como CD acompanhado de seu número correspondente. Em camundongos, um dos marcadores mais utilizados como pan-B é o antígeno CD45R/B220; entretanto este epítipo também é expresso em células T e NK ativadas. O antígeno CD19 é também considerado mais restrito à linhagem celular B. Entre outros marcadores murinos desta linhagem é possível citar CD138, CD157, CD35, CD21, CD40, CD72, CD22 e CD86 e CD80 (LAI *et al.*, 1998).

Estabelecendo-se um padrão de expressão normal de moléculas de superfície do linfócito B é possível detectar células anômalas com base na marcação imunohistoquímica destes antígenos (BAUMGARTH & ROEDERER, 2000). Em geral células neoplásicas apresentam padrões genotípicos e fenotípicos aberrantes, podendo exibir poliploidias, translocações cromossômicas e marcadores característicos de células indiferenciadas e/ou de outras linhagens

como CD40L (CD154) e CD30, normalmente expressos em de linfócitos T (BRUIN, *et al.* 1995; KALEEM, 2006; KUCHEN, *et al.*, 2007).

1.3 Plasmócitos anômalos: Mieloma e Plasmocitoma

Neoplasias hematológicas são um conjunto heterogêneo de doenças oncológicas relacionadas às células de linhagem hematopoiética. Baseado em características ontogênicas, morfológicas, genéticas, citogenéticas e imunofenotípicas das células tumorais é possível estabelecer uma nomenclatura que distingue suas diferentes manifestações. As diretrizes desta classificação são estabelecidas pela OMS e buscam facilitar a indicação de prognóstico e tratamento para os pacientes acometidos por esse tipo de enfermidade (ZHAN, *et al.* 2009).

Neoplasias que afetam plasmócitos normalmente se manifestam disseminadas em lesões na medula óssea, sendo então chamadas de mieloma múltiplo (BURMESTER & PEZZUTO, 2003). Mielomas são tumores secretores de anticorpos, derivados de linfócitos B em fase final de diferenciação (GAUTHIER *et al.*, 1996). Nas células de mieloma, ocorrem diversas mutações genéticas e dessa forma, alterações na sequência de aminoácidos e na estrutura das proteínas, que alteram a produção de imunoglobulinas (DURIE *et al.*, 2006). A utilização das atuais ferramentas de biologia celular e molecular revelou que o mieloma é uma doença heterogênea, associada com múltiplas anormalidades cromossômicas (BERGSAGEL & KUEHL, 2005) e padrões moleculares aberrantes (ZHAN *et al.*, 2009).

Normalmente, as plasmócitos constituem uma porção muito pequena (menos de 5%) das células da medula óssea. Os portadores de mieloma têm uma produção maior de plasmócitos anômalos que podem se acumular na medula óssea (intramedular) ou em outras localizações (extramedular). Tais acúmulos de plasmócitos são denominados plasmocitomas (DURIE *et al.*, 2006). A atual classificação da OMS sugere a denominação de mieloma múltiplo para a ocorrência generalizada de plasmocitomas no organismo, e apenas “plasmocitoma” para acúmulos isolados de células plasmáticas alteradas (THEML *et al.*, 2004).

Estudos na interface hematologia/imunologia têm permitido estabelecer paralelos entre as moléculas de superfície de células B e malignidades hematológicas, possibilitando o estabelecimento de diversos fenótipos celulares anômalos (TUCKER & LEBIEN, 2008). Atualmente a caracterização de células de mieloma pode ser feita por citometria de fluxo, utilizando-se um painel de anticorpos monoclonais contra os antígenos CD45, CD38, CD138 e CD56 (FUMARI *et al.*, 2005).

Como ocorre em todos os tipos de tumores, os mielomas tem o processo de apoptose inibido e, conseqüentemente, apresentam capacidade de realizar ilimitadas divisões celulares.

Aliada a essa característica, suas células isoladas (plasmocitomas) mantém as habilidades de secreção de imunoglobulinas, uma vez que originalmente são células secretoras da linhagem B (GAUTHIER *et al.*, 1996). Dessa forma, por volta da década de 70, foi despertado o interesse por estabelecer linhagens celulares de mieloma a fim de buscar modelos para a compreensão de vias biológicas tanto da própria doença, como de linfócitos B em geral (LYNCH *et al.*, 1979). Devido à dificuldade da época de se estabelecer linhagens celulares contínuas de mielomas humanos, investiu-se na criação de linhagens murinas de mieloma (HORIBATA & HARRIS, 1970).

1.3.1 Linhagens Celulares de Plasmocitoma Murino

Linhagens celulares de plasmocitoma murino podem ser utilizadas em diversas áreas da pesquisa, tais como análise de mutações somáticas espontâneas (ADETUGBO *et al.*, 1977), identificação dos mecanismos envolvidos no rearranjo dos genes referentes às imunoglobulinas (TILLEY & BIRSHTEN, 1985), ensaios de inibição do crescimento celular por fármacos (WALLS & KAY, 1982), expressão de proteínas recombinantes (BARNES *et al.*, 2000). Além disso algumas linhagens de plasmocitoma murino tem capacidade de secretar elevadas quantidades de interleucinas (KARASUYAMA & MELCHERS, 1988). Porém, o isolamento de linhagens de plasmocitomas murinos não secretores viabilizou uma de suas aplicações mais importantes: a criação do processo de produção de anticorpos monoclonais em larga escala (KHÖLER & MILSTEN, 1975).

Potter & Boyce (1962) descobriram que óleo mineral injetado na cavidade peritoneal de camundongo Balb/c produzia linfócitos B tumorais (plasmocitomas), chamados de MOPC21 (*Mineral Oil Plasmocitoma Cell*). Após sucessivas passagens, a linhagem MOPC21 foi submetida a diferentes condições de suplementação do meio de cultura, sendo cultivadas *in vitro* e também em ascites murinas. Desse processo resultou uma população heterogênea de células secretoras de imunoglobulina, capazes de crescer em suspensão, chamadas de P3K (HORIBATA & HARRIS, 1970).

A linhagem P3K foi então submetida a diversas clonagens, originando duas novas diferentes linhagens: P3-X27 e 289-16. Ambas são linhagens não secretoras de imunoglobulinas. Entretanto, a linhagem 289-16 manteve a capacidade de sintetizar apenas a cadeia leve das imunoglobulinas, sendo então renomeada como linhagem NS1. As células da linhagem NS1 resistentes a 8-azaguanina foram isoladas e clonadas, dando origem à linhagem P3/NS1/1-Ag4-1, que por sua vez passou por diversas subclonagens visando à obtenção de células incapazes de sintetizar cadeias leves e pesadas de imunoglobulinas. Esse processo de seleção deu origem à linhagem de mieloma murino atualmente conhecida como NSO/1 (BARNES *et al.*, 2000).

Passando por um processo semelhante, as células da linhagem P3-X27, foram selecionadas para deficiência na enzima hipoxantina fosforibosil transferase (HPRT), resultando na linhagem P3X63Ag8 (YOO *et al.*, 2002). A partir de clonagens sucessivas de P3X63Ag8, foi possível o estabelecimento de uma outra linhagem celular estável, que também perdeu a capacidade de sintetizar cadeias leves e pesadas de imunoglobulina, multiplicando-se indefinidamente em cultura, denominada P3X63Ag8.653 (KEARNEY *et al.*, 1979). P3X63Ag8.653 foi posteriormente fundida com linfócitos de baço de camundongo Balb/c imunizados com hemácias de carneiro, gerando a linhagem SP2/HLGK, que por meio de sucessivas subclonagens deu origem a linhagem atualmente denominada SP2/0-Ag14 (SHULMAN *et al.*, 1978). As mudanças sofridas pelas diferentes linhagens de plasmocitoma não secretores podem ser observadas na Figura 3.

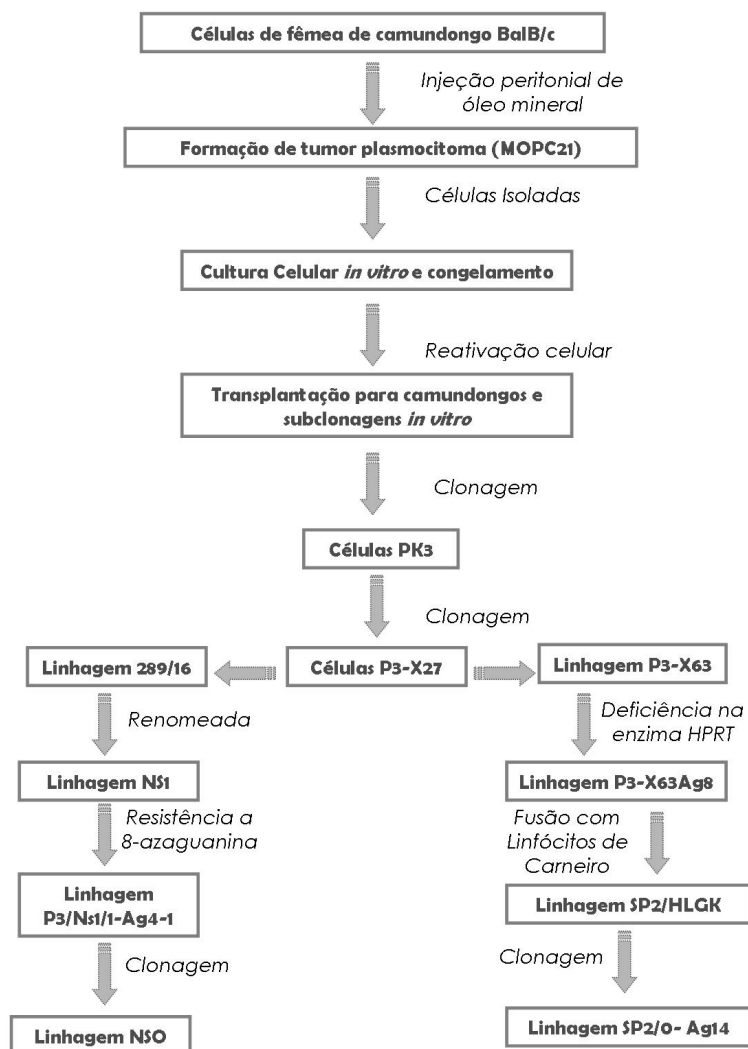


Fig. 3: Esquema geral dos processos utilizados para o isolamento de diferentes linhagens de plasmocitomas murinos não secretores.

As linhagens de mielomas atualmente mais utilizadas para a produção de anticorpos monoclonais são: P3X63Ag8.653, SP2/0-Ag14 e NOS/1. São células que podem ser facilmente utilizadas nesse processo, pois crescem naturalmente em suspensão, permitem uma grande escala de produção e podem ser adaptadas a diferentes condições de cultura celular (YOO *et al.*, 2002).

2. Justificativa

Atualmente, a técnica de produção de anticorpos monoclonais é amplamente difundida, entretanto, ainda um processo de alto custo e muito laborioso. Do início (imunização de camundongos) até o final do experimento (estabilidade dos clones formados), o método requer, em média, 3 a 4 meses de trabalho contínuo. Pouco se conhece a respeito da biologia das células de plasmocitomas murinos, mesmo frente a seu importante papel na formação de hibridoma secretores de anticorpos monoclonais. Não há relatos precisos sobre marcadores específicos para estas células, sendo encontrada pouca informação na literatura em relação à caracterização das diferentes linhagens avaliadas nesse trabalho, o que limita tanto o conhecimento a respeito de cada linhagem especificamente, como possíveis análises comparativas. Dessa forma, a realização de uma análise dos marcadores de superfície das diferentes linhagens de plasmocitomas murinos não secretores e sua comparação com marcadores expressos por hibridomas se torna importante. Partindo de uma caracterização precisa destas linhagens, é possível fornecer subsídios para futuramente explorar características desejáveis para o aprimoramento da técnica de produção de anticorpos monoclonais.

3. Objetivos

Este projeto teve como objetivo caracterizar diferentes linhagens celulares de mieloma murino (P3X63Ag8.653, SP2/0-Ag14 e NS1) utilizados na produção de anticorpos monoclonais, bem como os hibridomas 46C e 9C7, através da expressão de antígenos de superfície celular.

3.1 Objetivos específicos

- i. estabelecer parâmetros de detecção de citometria de fluxo específicos para as linhagens celulares P3X63Ag8.653, SP2/0-Ag14 e NS1 de mieloma murino;
- ii. estabelecer parâmetros de detecção de citometria de fluxo específicos para os hibridomas secretores de anticorpos monoclonais 46C e 9C7;
- iii. estabelecer os valores da intensidade de fluorescência para cada detector (FL1, FL2 e FL3) dos diferentes antígenos utilizados para cada linhagem celular avaliada;
- iv. padronizar os protocolos de marcação de superfície celular para as diferentes linhagens celulares estudadas;
- v. caracterizar imunofenotipicamente as linhagens celulares P3X63Ag8.653, SP2/0-Ag14 e NS1 de plasmocitoma murino.
- vi. caracterizar imunofenotipicamente os hibridomas 46C e 9C7;
- vii. comparar o perfil imunofenotípico das linhagens de plasmocitoma P3X63Ag8.653, SP2/0-Ag14 e NS1 e dos hibridomas 46C e 9C7.

4. Materiais e Métodos

4.1 Linhagens celulares

Foram utilizadas três diferentes linhagens celulares de mieloma murino: P3X63Ag8.653, SP2/0 Ag14 e NS1. A linhagem P3X63Ag8.653 é procedente do estoque mantido pelo Laboratório de Imunologia Aplicada (LIA), Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UFSC. A linhagem celular NS1 foi gentilmente cedida pela professora Dra. Elenice Deffune do Laboratório de Engenharia Celular, Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP). A linhagem celular SP2/0-AG14, código CR034 é proveniente do Banco de Células do Rio de Janeiro (Rio de Janeiro, RJ).

As células de hibridomas utilizadas neste estudo foram produzidas no LIA e são provenientes do estoque mantido por este laboratório. A linhagem celular 46C é secretora de anticorpos monoclonais de isotipo IgG contra a proteína do capsídeo do vírus da mionecrose infecciosa de camarões, produzido por Mariana Borsa, enquanto que a linhagem 9C7 é secretora de anticorpos monoclonais de isotipo IgM contra uma proteína do capsídeo do vírus rábico, produzido por Camila Zanluca.

As linhagens celulares citadas acima são células não aderentes, mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. As passagens celulares foram realizadas a cada três dias aproximadamente, sendo as linhagens celulares P3X63Ag8.653, NS1, 46C e 9C7 mantidas em meio de cultura RPMI (Cultilab[®], Campinas, Brasil), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Cultilab[®]) e 1% de PSA (Penicilina, Estreptomicina e Anfotericina B) (Sigma[®], Stenheim, Alemanha), enquanto que a linhagem celular SP2/0-Ag14 foi mantida em meio de cultura Dulbecco's MEM (Cultilab[®]), suplementado com 10% de SFB e 1% de PSA .

4.2 Marcação da superfície celular

As células provenientes de cultura foram centrifugadas em tubo cônico a 300 x *g* por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células suspensas em solução tampão de FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter: PBS suplementado com 2% de SBF e 5 mM de EDTA). Esse procedimento foi repetido uma vez e em seguida as células foram coradas com azul de Tripán e submetidas à contagem em câmara de Neubauer.

Posteriormente, as células foram colocadas em placas de 96 cavidades (1×10^6 células por cavidade), em volume de até 150 μ l. Em seguida a placa foi centrifugada a $250 \times g$ por 5 minutos a 18°C , sendo essas condições mantidas em todas as demais centrifugações realizadas. O sobrenadante foi descartado e as células incubadas com 50 μ l de soro inativado de camundongo diluído 100 vezes, por 10 min, a 4°C . Em seguida, a placa foi lavada com tampão de FACS, novamente centrifugada e o sobrenadante descartado. A seguir, as células foram marcadas, utilizando-se 50 μ l de cada anticorpo diluído (conforme descrito no item 5.1), sendo as células incubadas por 30 min, a 4°C , protegidas da luz. Procedeu-se nova centrifugação e descarte do sobrenadante, para então as células serem suspendidas em 600 μ l de tampão de FACS e transferidas para tubos próprios para citometria de fluxo. A temperatura dos reagentes utilizados foi de 4°C e durante todo o processo as amostras foram mantidas no gelo.

Os anticorpos utilizados são dirigidos contra diferentes antígenos de superfície a saber CD19, CD21-35, CD22.2, CD23, CD25, CD30, CD38, CD40, CD45/B220, CD69, CD72, CD79b, CD80, CD117, CD138, CD154, CD184 (Tabela 1). Todos os anticorpos tem como fonte comercial a empresa BD Pharmingen® (San Jose, EUA).

Tabela 2: Pannel de anticorpos monoclonais (AcMo) utilizados na caracterização das linhagens celulares avaliadas.

AcMo	Fluorocromo	Clone	Especificidade
CD19	FITC, PE e PerCp	1D3	Pan - linfócitos B
CD21/CD35	PE	7G6	Linfócitos B periféricos
CD22.2	PE	Cy34.1	Linfócitos B periféricos
CD23	FITC	B3B4	Linfócitos B em repouso
CD25	FITC	3C7	Linfócitos ativados
CD30	PE	mCD30.1	Linfócitos T ativados
CD38	PE	90	Linfócitos ativados
CD40	FITC	mar/23	Diferentes estágios de maturação do linfócito B
CD45/B220	PE	RA3-6B2	Pan-leucocitário
CD69	PerCP-Cy5.5	H1.2F3	Ativação de linfócitos
CD72	PE	JY/93	Linfócito B em desenvolvimento
CD79b	FITC	HM79b	Linfócitos B
CD80 (B7-1)	FITC	16-10A1	Induzível em Linfócito B
CD117	FITC	2B8	Diferenciação celular leucocitária
CD138	PE	281-2	Diferenciação e desenvolvimento de Linf. B
CD154	PE	MR1	Ativação de linfócitos T
CD184	FITC	2B11/CXC R4	Receptor de quimiocinas presente em diversas células

A determinação dos perfis imunológicos foi realizada por aquisição das amostras em citômetro de fluxo, modelo FACSCalibur® (Becton Dickinson), utilizando o programa CellQuest® (BD Biosciences) e posterior análises com o programa FlowJo (© Tree Star, Inc.) versão 8.6.3.

4.3 Padronização dos valores de detecção, aquisição das amostras e estratégia de *gates*

Para determinar os parâmetros citométricos de dispersão da luz frontal (*forward scatter* - FSC) e dispersão de luz lateral (*side scatter* - SSC) células não marcadas foram adquiridas em citômetro de fluxo e através de ajustes minuciosos nos detectores FSC e SSC definiu-se os valores ideais destes parâmetros para cada linhagem avaliada neste estudo. Foram realizados também ajustes nos detectores FL1, FL2 e FL3 a fim de determinar o perfil da população quando não marcada (controle negativo).

A intensidade de fluorescência dos antígenos das diferentes linhagens celulares foi determinada separadamente para cada detector utilizando-se os anticorpos primários anti-CD184 FITC (fluoresceína) para FL1, anti CD-138 PE (ficoeritrina) para FL2 e anti-CD45/B220 conjugado com PECy-5 (ficoeritrina-cianina) para FL3. As células foram marcadas conforme descrito no item 4.2 e durante a aquisição foram realizados os ajustes nos detectores (FL1 versus FL2, FL2 versus FL1, FL2 versus FL3 e FL3 versus FL2) até a obtenção de valores ideais para cada linhagem celular analisada.

Estabelecidos os padrões de detecção, células das linhagens celulares P3X63Ag8.653, SP2/0-Ag14, NS1, 46C e 9C7 marcadas conforme descrito no item 4.2 foram adquiridas em citômetro de fluxo, totalizando 100.000 eventos. Todos os parâmetros pré-estabelecidos foram confirmados a cada aquisição.

Para a avaliação da presença ou ausência das moléculas relacionadas aos anticorpos citados no item 4.2 inicialmente foram estabelecidos *gates* baseados nos parâmetros de SSC e FSC. Em seguida, cada subpopulação foi analisada separadamente para a determinação da expressão dos marcadores. A análise da expressão foi realizada através da comparação do perfil de células não marcadas (controle negativo) com aquele de células marcadas com os anticorpos utilizados. Sempre que possível foram utilizados *gates* de quadrante para determinar a porcentagem de células positivas, negativas e duplo positivas. Entretanto, algumas populações celulares apresentaram muita auto-florescência, sendo necessário nestes casos o uso de *gates* assimétricos.

4.4 Cálculo dos valores de intensidade média de fluorescência dos marcadores

A fim de avaliar o nível de expressão dos marcadores utilizados, nas diferentes linhagens celulares avaliadas, foram calculados os valores de intensidade média de fluorescência (MFI). Para tal, estabeleceram-se categorias arbitrárias de acordo com os valores encontrados. Valores

de MFI de 0 a 25 são representados por (-), de 26 a 50 por (+), de 51 a 100 por (++), de 101 a 150 por (+++), de 151 a 200 por (++++), e valores acima de 201 são representados por (+++++).

5. Resultados

5.1 Determinação dos valores de concentração dos anticorpos utilizados

Inicialmente foi determinada a concentração ideal de cada anticorpo a ser utilizado nos experimentos através do processo de diluição seriada (titulação). Foram realizadas marcações celulares nas diferentes linhagens avaliadas com diferentes concentrações de cada anticorpo (4×10^{-3} mg/mL, 2×10^{-3} mg/mL, 4×10^{-4} mg/mL e 4×10^{-5} mg/mL). O título ideal de cada anticorpo foi determinado de acordo com a maior média de intensidade de fluorescência (IMF) apresentada, que foi similar em todas as linhagens analisadas, sendo utilizadas as mesmas concentrações de cada anticorpo nas diferentes linhagens. Dessa forma, elegeram-se as concentrações que apresentaram maior IMF (Tabela 3) para serem utilizadas ao longo deste trabalho.

Tabela 3: Concentrações dos anticorpos monoclonais utilizados na marcação celular das linhagens celulares.

Anticorpos	Concentração (mg/mL)
Anti-CD19	4×10^{-3}
Anti-CD21/CD35	10^{-2}
Anti-CD22.2	4×10^{-3}
Anti-CD23	10^{-2}
Anti-CD25	10^{-2}
Anti-CD30	4×10^{-3}
Anti-CD38	4×10^{-3}
Anti-CD40	10^{-2}
Anti-CD45/B220	4×10^{-3}
Anti-CD69	4×10^{-3}
Anti-CD72	4×10^{-3}
Anti-CD79b	10^{-2}
Anti-CD80 (B7-1)	10^{-2}
Anti-CD117	10^{-2}
Anti-CD138	4×10^{-4}
Anti-CD154	4×10^{-3}
Anti-CD184	10^{-2}

5.1 Determinação dos padrões de SCC e FSC das linhagens celulares avaliadas

Os primeiros parâmetros determinados para cada linhagem celular foram relativos a tamanho (FSC) e complexidade celular interna (SSC). Para tal, em diferentes experimentos, separadamente células não marcadas de cada linhagem avaliada neste estudo foram adquiridas em citômetro de fluxo e durante a aquisição dos eventos realizaram-se ajustes nos detectores de FSC e SSC. Após o estabelecimento dos parâmetros para cada linhagem analisada foi possível observar claramente a ocorrência de dois picos distintos para os valores de FSC (Figura 4), sugerindo a existência de duas subpopulações distintas com relação a esse parâmetro, dentro de uma mesma linhagem.

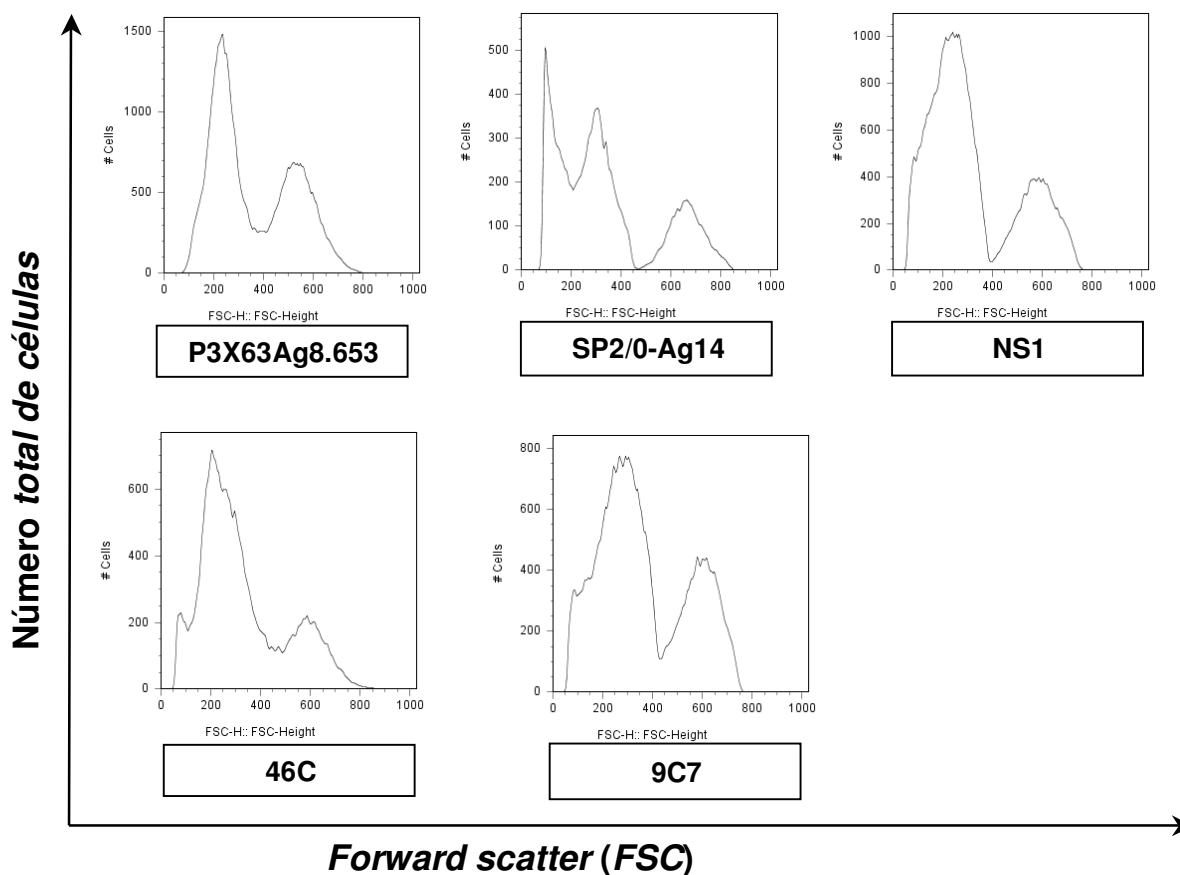


Fig. 4: Análise dos padrões de FSC das linhagens celulares avaliadas neste estudo. Células não marcadas das linhagens celulares P3X63Ag8.653, SP2/0-Ag14, NS1, 46C e 9C7 foram adquiridas em citômetro de fluxo, sendo avaliado o parâmetro FSC. Nos histogramas estão demonstrados o número total de células (eixo y) e os diferentes valores de FSC (eixo x) encontrados em cada linhagem celular. Estes resultados são representativos de três experimentos independentes.

De acordo com a avaliação de FSC, células com menor tamanho foram denominadas população 1 e as de maior tamanho população 2. Além de diferentes valores de FSC, estas duas subpopulações apresentam também valores médios de SSC distintos (Tabela 4).

Tabela 4: Valores médios de FSC e SSC para subpopulações observadas nas diferentes linhagens avaliadas.

<i>Linhagem celular</i>	<i>POPULAÇÃO 1</i>		<i>POPULAÇÃO 2</i>	
	Valor médio de FSC	Valor médio de SSC	Valor médio de FSC	Valor médio de SSC
P3X63Ag8	217,20	287,10	530,59	304,49
SP2\0Ag14	172,41	315,92	613,21	333,98
NS1	226,02	294,03	528,83	260,60
9C7	249,95	293,33	596,31	274,68
46C	262,41	268,85	397,17	115,91

Quando observado o perfil de cada população em histograma das variáveis SSC x FSC a presença das subpopulações 1 e 2 é evidente como pode ser observado na Figura 5.

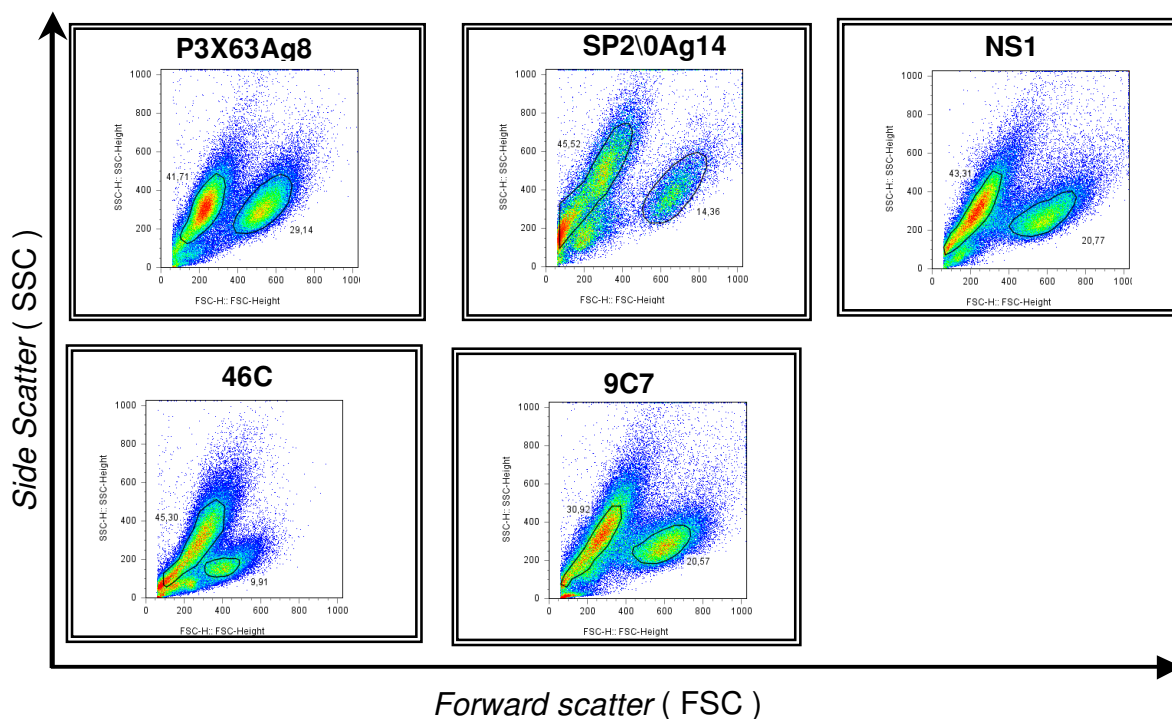


Fig. 5: Perfil de expressão dos padrões SSC e FSC das linhagens celulares P3X63Ag8.653, SP2/0-Ag14, NS1, 46C e 9C7.

5.2 Imunofenotipagem das linhagens celulares P3X63Ag8.653, SP2/0-Ag14 e NS1.

A fim de determinar o perfil imunofenotípico das linhagens de plasmocitoma avaliadas foram realizadas marcações celulares com anticorpos dirigidos a diferentes antígenos de superfície celular seguida de aquisição em citômetro de fluxo. Para facilitar as análises os marcadores foram agrupados segundo a funcionalidade das moléculas as quais estão relacionados. De acordo com a variação dos fluorocromos conjugados aos anticorpos de cada grupo, foram realizadas duplas marcações ou marcações com um único anticorpo. Os grupos definidos estão resumidos na Tabela 5.

Tabela 5: Critérios de agrupamento dos anticorpos utilizados para a realização de imunofenotipagem das linhagens celulares P3X63Ag8.653, SP2/0-Ag14, NS1, 46C e 9C7.

Grupos	AcMo	Fluorocromo
Moléculas acessórias do Complexo BCR (ativação)	CD79b	FITC
	CD21/35	FITC
	CD19	PE
Moléculas acessórias do Complexo BCR (regulação)	CD22.2	PE
	CD72	PE
Marcadores de ativação celular	CD25	FITC
	CD69	PerCP-Cy5.5
Moléculas co-estimulatórias de interação com linfócito T	CD40	FITC
	CD80	FITC
Moléculas relacionadas ao fenótipo de plasmócitos	CD184	FITC
	CD138	PE
	CD38	PE
	CD45B/220	PE.-Cy5

Dentre os marcadores não agrupados estão CD117, CD30, CD23 e CD154, uma vez que não foram expressos por nenhuma das linhagens avaliadas (dados não mostrados).

5.2.1 – Expressão de moléculas de ativação acessórias do complexo BCR.

As moléculas CD19, CD21 e CD35 formam um complexo protéico e em conjunto com CD79a e CD79b, são co-receptores responsáveis por fornecer sinais ativadores ao BCR e promover a ativação da célula B (DIAMANT *et al.*, 2005; CHEN *et al.*, 2000). A fim de avaliar a presença ou ausência de moléculas acessórias ao BCR, responsáveis por sua ativação, foram realizadas marcações celulares com os anticorpos anti-CD19, anti-CD21/35 e anti-CD79b, sendo os resultados analisados conjuntamente.

A molécula CD19 não foi expressa na maioria das linhagens avaliadas, exceto em NS1 e apenas em sua subpopulação 2. A molécula CD21.CD35 não foi expressa em nenhuma das linhagens celulares. O perfil de expressão destes marcadores em cada linhagem avaliada pode ser observado na Figuras 6.

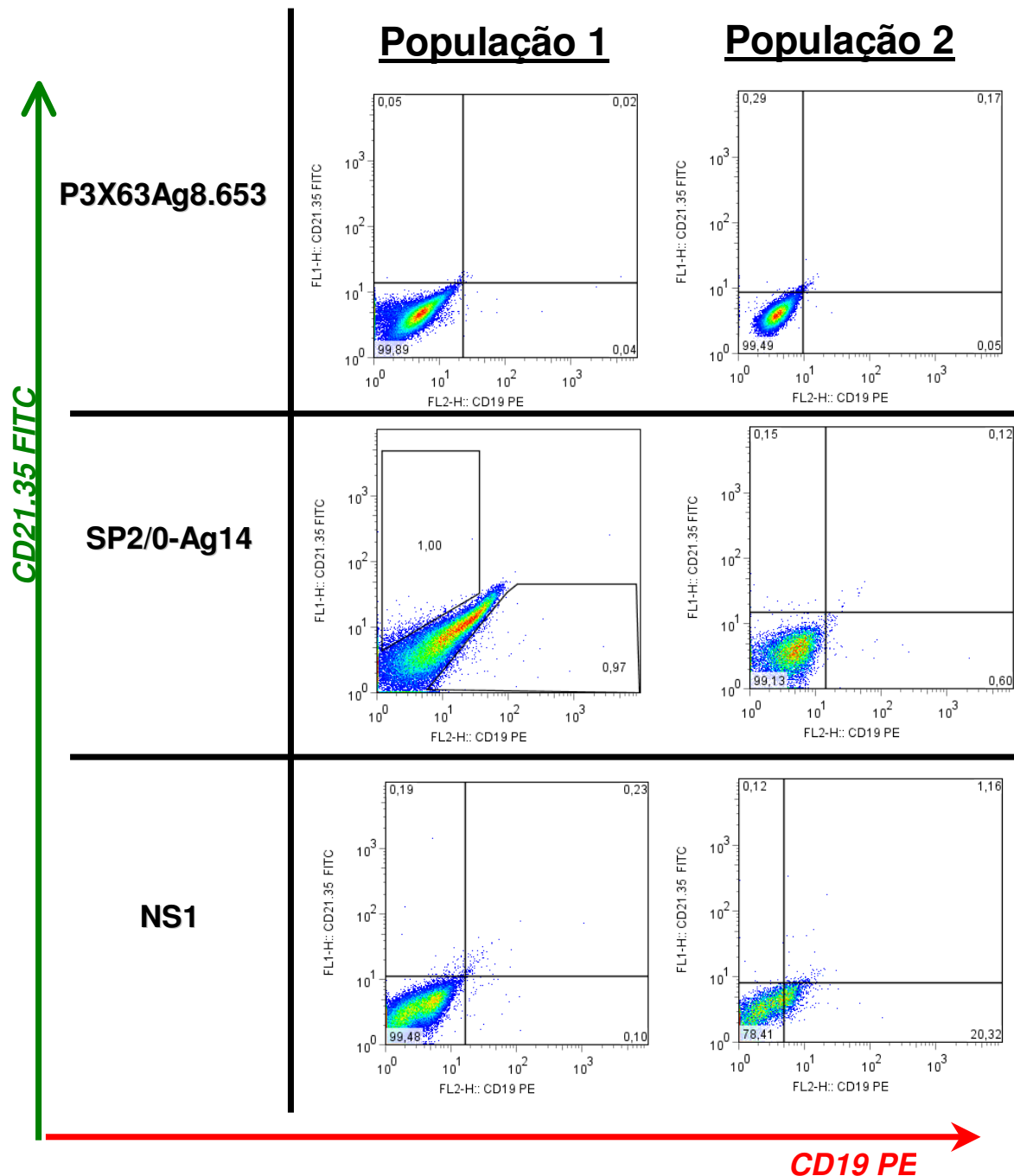


Fig 6: Avaliação da expressão das moléculas de ativação acessórias do complexo BCR nos plasmocitomas murinos analisados. Células das linhagens P3X63Ag8.653, SP2/0-Ag14 e NS1 foram marcadas com anticorpos anti-CD19 PE (eixo x) e anti-CD21.35 FITC (eixo y) e adquiridas em citômetro de fluxo. As análises dos marcadores foram realizadas separadamente para população 1 e população 2, conforme descrito no 5.1. Estes resultados são representativos de três experimentos independentes.

Em contrapartida, CD79b foi expresso nas linhagens celulares SP2/0-Ag14 e NS1. A exceção foi a linhagem P3X63Ag8 que não apresentou expressão deste marcador (Fig 7). Dentre as linhagens positivas para CD79b, as subpopulações 1 apresentaram maior porcentagem de células marcadas. Dessa forma dentre as moléculas acessórias de ativação do BCR, CD79b foi a que apresentou expressão mais relevante.

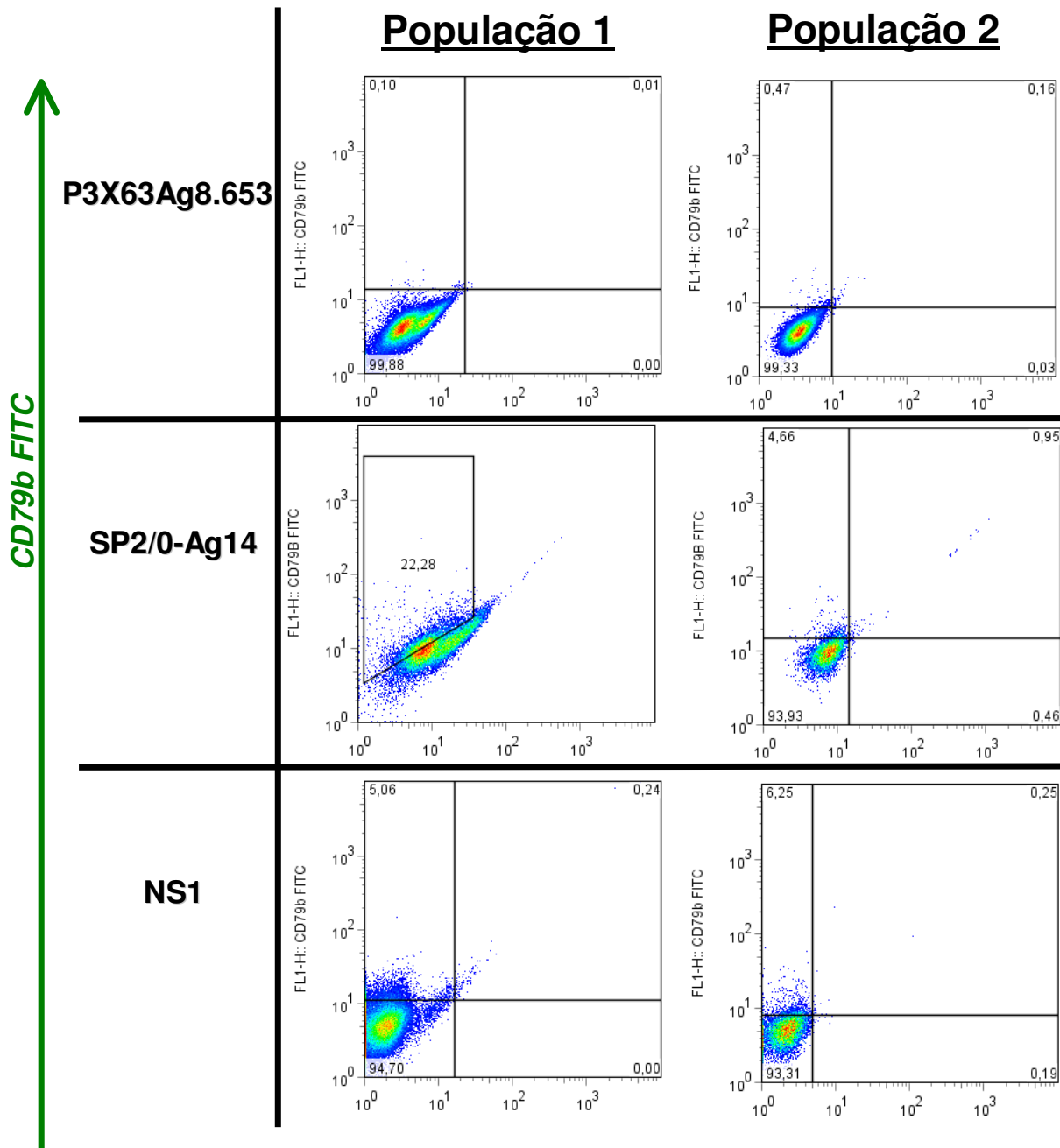


Fig 7: Avaliação da expressão das moléculas de ativação acessórias do complexo BCR nos plasmocitomas murinos analisados. Células das linhagens P3X63Ag8.653, SP2/0-Ag14 e NS1 foram marcadas com anticorpos anti-79b FITC (eixo y) e adquiridas em citômetro de fluxo. As análises dos marcadores foram realizadas separadamente para população 1 e população 2, conforme descrito no 5.1. Estes resultados são representativos de três experimentos independentes.

5.2.2 – Expressão de moléculas de regulação acessórias do complexo BCR

As moléculas CD22 e CD72 são co-receptores que atuam em conjunto na modulação do BCR, determinando se o estímulo recebido inicia um processo de apoptose ou proliferação celular (NITSCHKE & TSUBATA, 2004). Foram realizadas marcações celulares com anticorpos anti-CD22 e anti-CD72 a fim de se observar a presença destes marcadores de regulação na superfície das células avaliadas.

Dentre as linhagens de plasmocitoma murino, apenas P3X63.Ag18 não apresentou expressão destas proteínas. A linhagem SP2/0-Ag14 apresentou expressão de ambas as moléculas, tanto na subpopulação 1 (em menor porcentagem) como na subpopulação 2. Os resultados obtidos para a molécula CD22 nesse grupo celular foram heterogêneos entre suas duas subpopulações, sendo mais expressivos na subpopulação 2. Ainda nas células da linhagem SP2/0-Ag14 foi observada a expressão mais significativa de CD72, com as maiores porcentagens de células positivas para esse marcador em comparação as demais linhagens.

A linhagem celular NS1 por sua vez, apresentou estes co-receptores apenas na subpopulação 2, sendo a porcentagem de células positivas para CD72 maior que para CD22. Para ambos os marcadores foram observadas expressões mais significativas nas subpopulações 2 (Fig. 8 e 9).

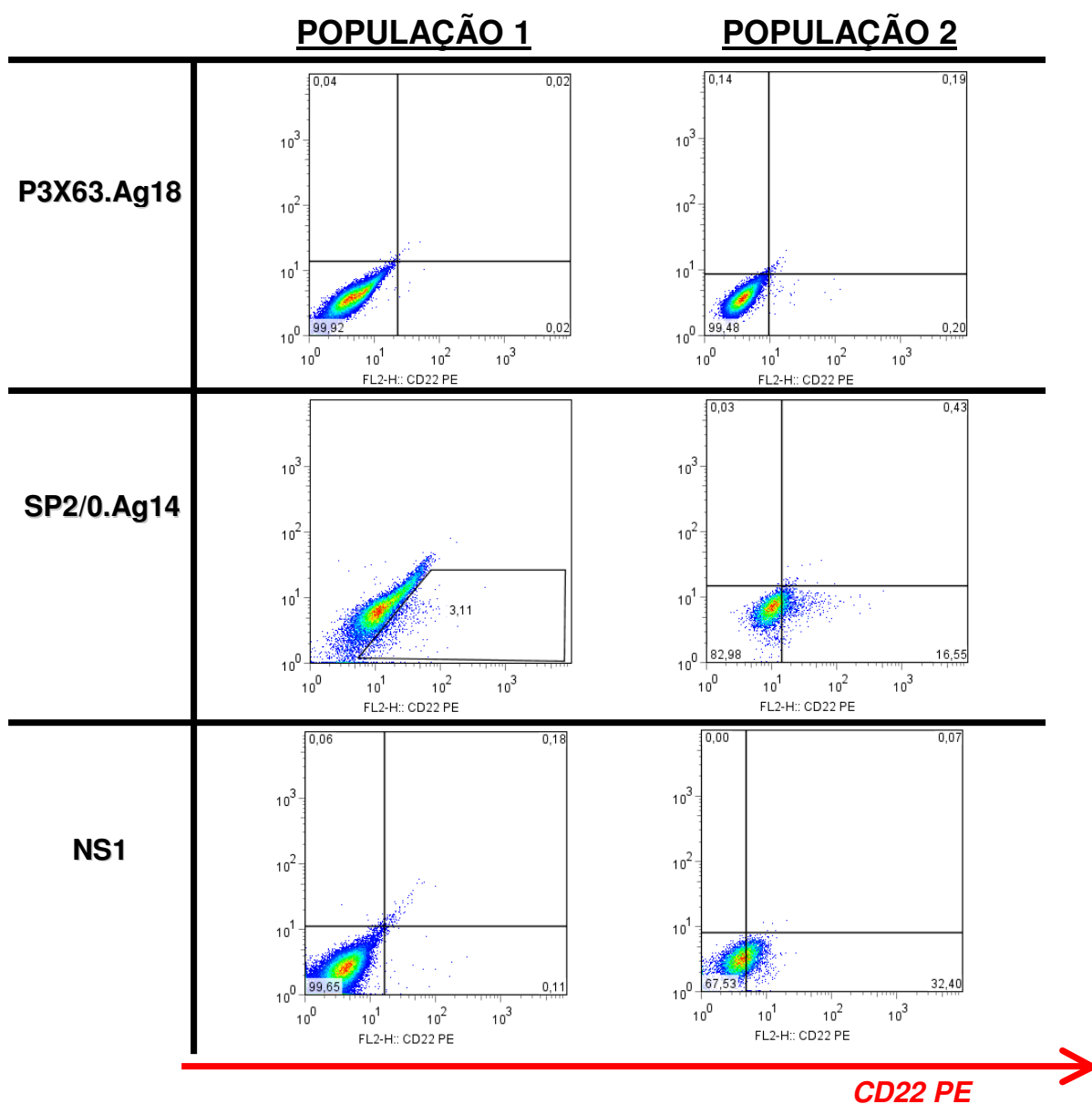


Fig.9 : Avaliação da expressão das moléculas de regulação acessórias do complexo BCR nos plasmocitomas murinos analisados. Células das linhagens P3X63Ag8.653, SP2/0-Ag14 e NS1 foram marcadas com anticorpos anti-22 PE (eixo x) e adquiridas em citômetro de fluxo. As análises dos marcadores foram realizadas separadamente para população 1 e população 2, conforme descrito no 5.1. Estes resultados são representativos de três experimentos independentes.

Assim, observou-se um padrão de expressão conjunta destes marcadores. Em todas as linhagens celulares avaliadas, ambos estiveram presentes ou ausentes, não ocorrendo a expressão isolada de apenas CD22 ou CD72.

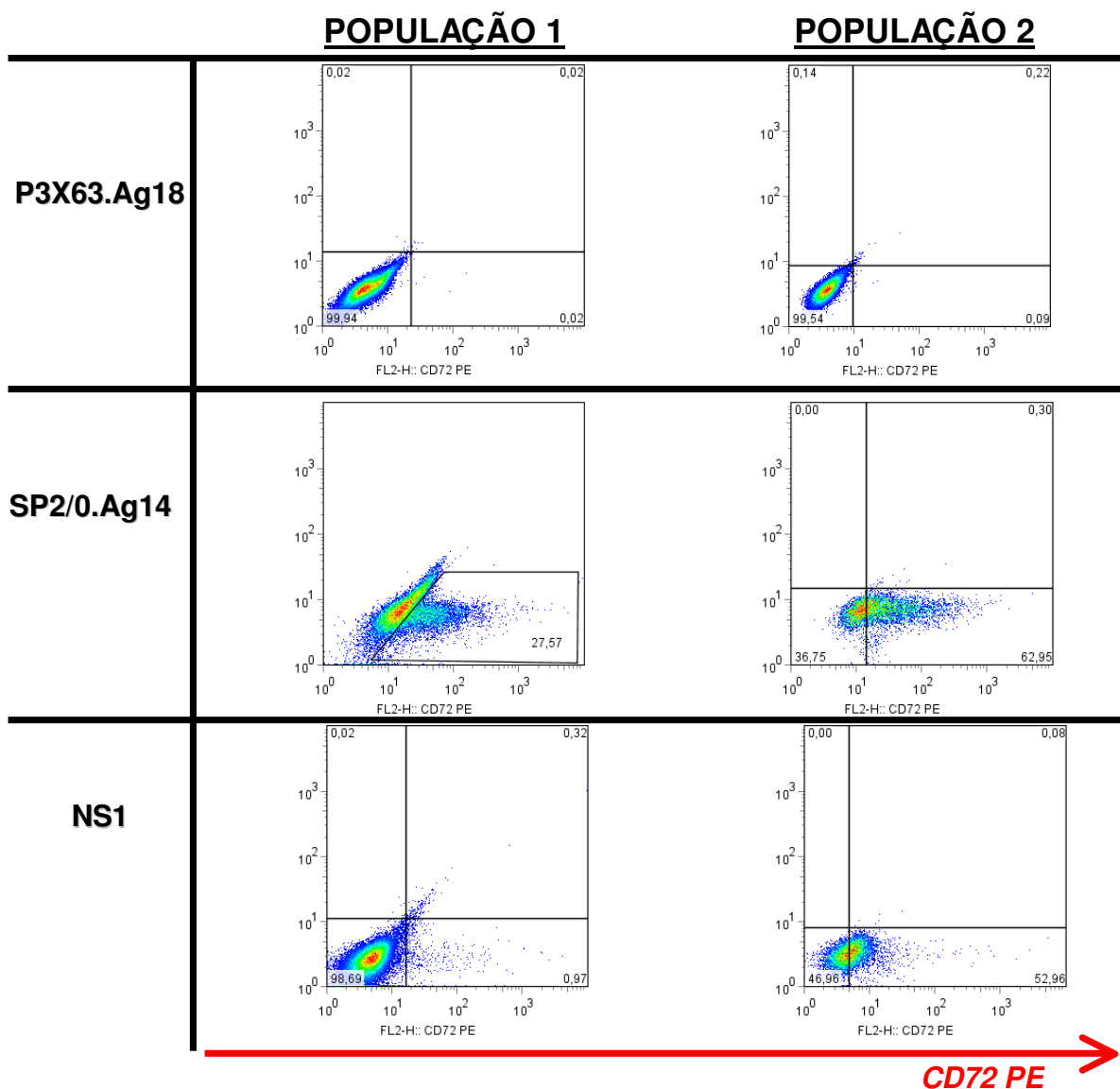


Fig. 9 : Avaliação da expressão das moléculas de regulação acessórias do complexo BCR nos plasmocitomas murinos analisados. Células das linhagens P3X63Ag8.653, SP2/0-Ag14 e NS1 foram marcadas com anticorpos anti-72 PE (eixo x) e adquiridas em citômetro de fluxo. As análises dos marcadores foram realizadas separadamente para população 1 e população 2, conforme descrito no item 5.1. Estes resultados são representativos de três experimentos independentes.

5.2.3 – Expressão de moléculas de ativação celular

As moléculas CD69 e CD25 são utilizadas como marcadores de ativação celular (SHEN & WU, 2008). A fim de avaliar a ocorrência de ativação nas linhagens celulares estudadas, foram realizadas marcações celulares com os anticorpos anti-CD25, anti-CD69, sendo os resultados analisados conjuntamente.

Dentre as linhagens de plasmocitomas murinos analisadas foram encontrados indícios de ativação, sendo a molécula CD25 altamente expressa nestas três linhagens celulares. A linhagens

celulares P3X63Ag8.653 e SP2/0-Ag14 apresentam expressão de CD25 apenas na subpopulação 1, não apresentando expressão de CD69. Em contrapartida, a linhagem celular NS1 expressou ambos os marcadores, sendo a presença de CD25 encontrada em ambas subpopulações (mais expressiva na subpopulação 1) e a presença de CD69 exclusivamente na subpopulação 2 (Figura 10).

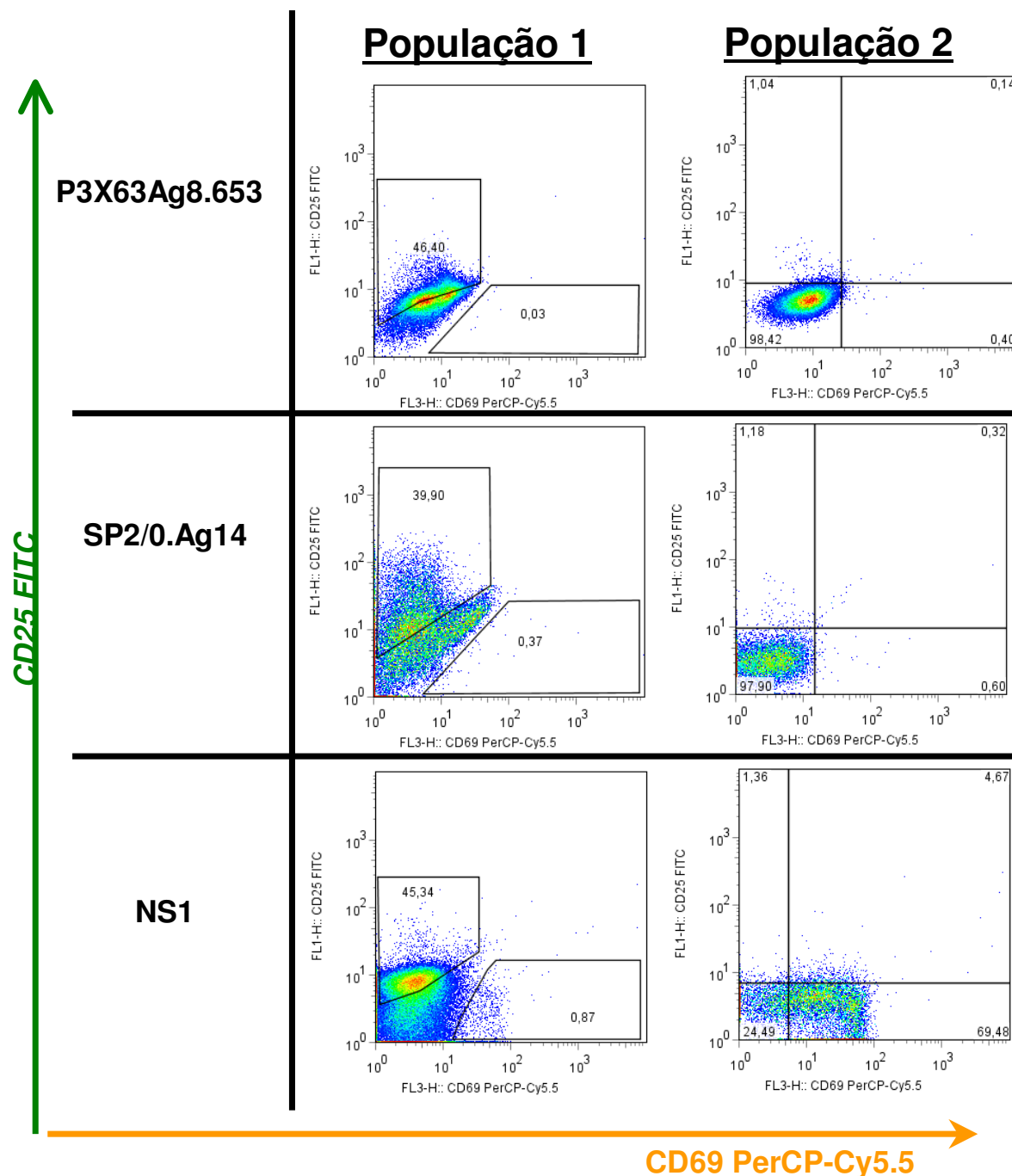


Fig. 10: Avaliação da expressão de moléculas de ativação nos plasmocitomas murinos analisados. Células das linhagens P3X63Ag8.653, SP2/0-Ag14 e NS1 foram marcadas com anticorpos anti-CD25 FITC (eixo y) e anti-CD69 PerCP-Cy5.5 (eixo x) e adquiridas em citômetro de fluxo. As análises dos marcadores foram realizadas separadamente para população 1 e população 2, conforme descrito no item 5.1. Estes resultados são representativos de três experimentos independentes.

5.2.4 – Expressão de moléculas co-estimulatórias de interação com Linfócito B

As moléculas CD40 e CD80 são duas importantes moléculas expressas na superfície de linfócitos B responsáveis por sua interação com linfócitos T (SUVAS *et al.*, 2002; BERGWELT-BAILDON *et al.*, 2006). A fim de avaliar a presença ou ausência destas moléculas nas linhagens celulares avaliadas, foram realizadas marcações celulares com os anticorpos anti-CD40 e anti-CD80, sendo os resultados analisados conjuntamente.

Pode-se observar que não houve uma distribuição homogênea da presença destes marcadores nas linhagens avaliadas. As linhagens celulares P3X63Ag8.653 e SP2/0-Ag14 expressam ambas as moléculas em suas duas subpopulações. Entretanto, P3X63Ag8.653 tem maior expressão de CD40, enquanto que SP2/0-Ag14 apresenta maior expressão de CD80. A linhagem NS1 foi mostrou menor expressão de CD80 e nenhuma expressão de CD40. A expressão destas moléculas em cada linhagem avaliada pode ser observada nas figuras 11 e 12.

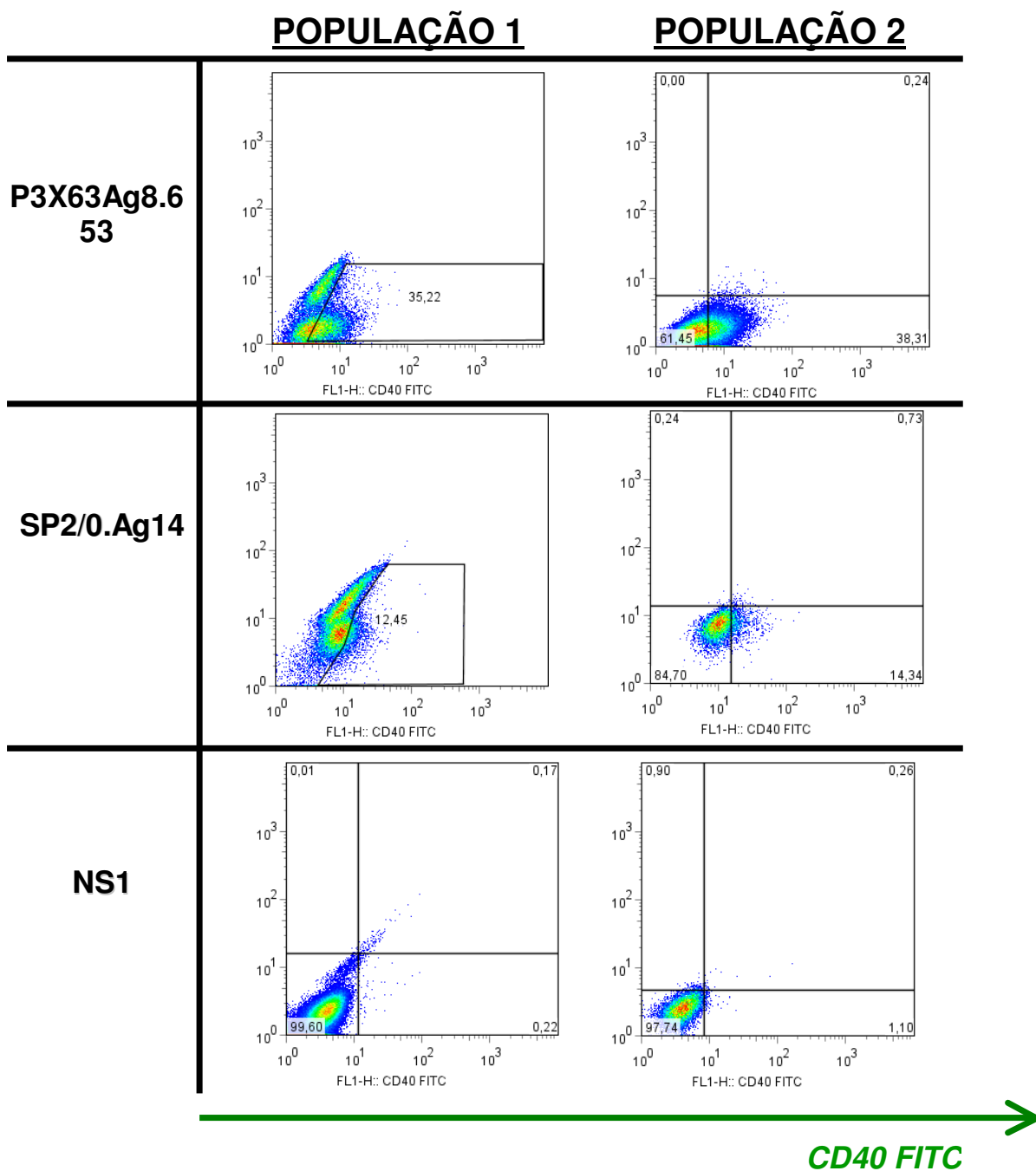


Fig. 11: Avaliação da expressão das moléculas de interação com linfócito T nos plasmocitomas murinos analisados. Células das linhagens P3X63Aq8.653, SP2/0-Aq14 e NS1 foram marcadas com anticorpos anti-CD40 FITC (eixo x) e adquiridas em citômetro de fluxo. As análises dos marcadores foram realizadas separadamente para população 1 e população 2, conforme descrito no item 5.1. Estes resultados são representativos de três experimentos independentes.

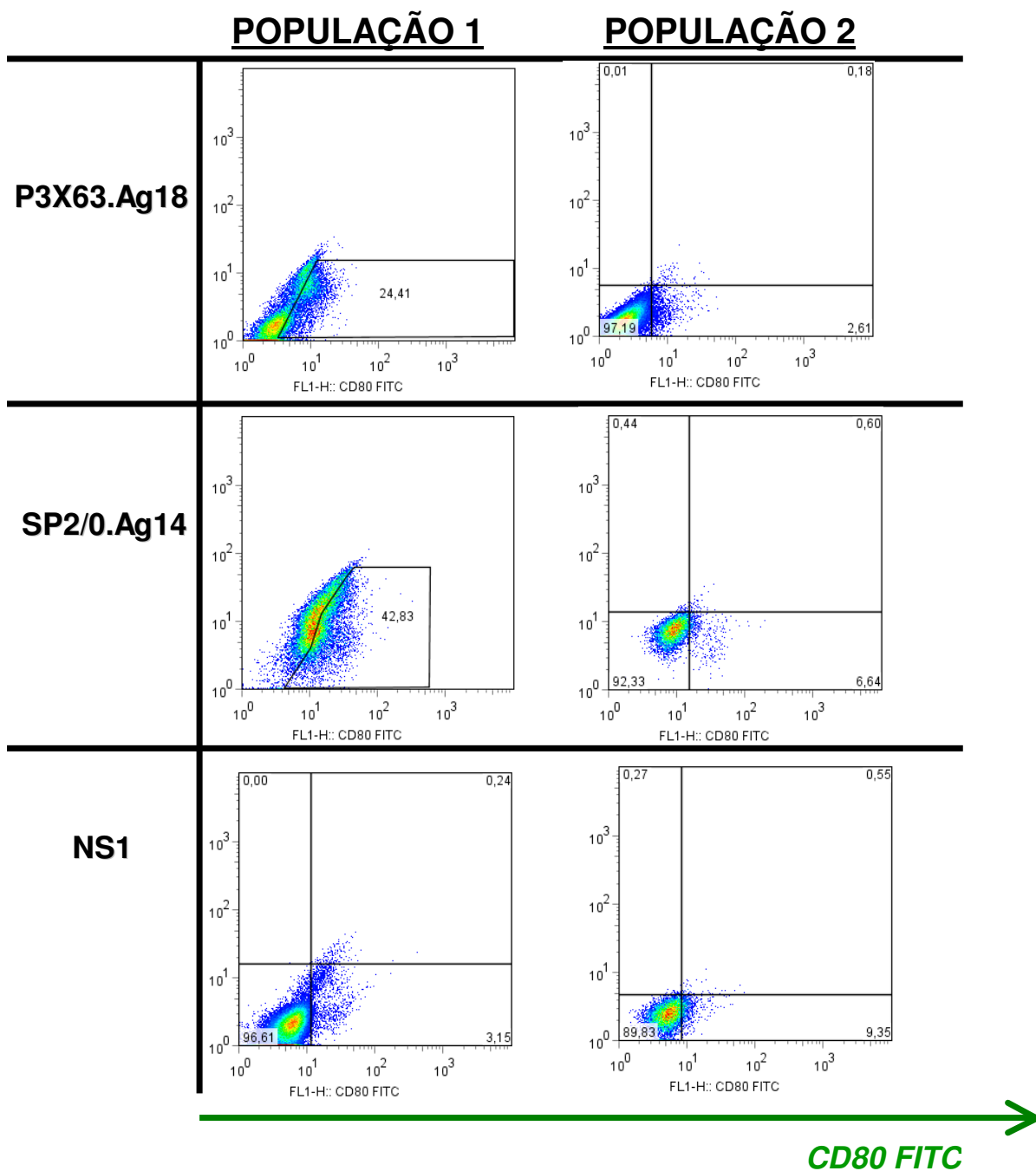


Fig. 12: Avaliação da expressão das moléculas de interação com linfócito T nos hibridomas analisados. Células das linhagens P3X63Aq8.653, SP2/0-Aq14 e NS1 foram marcadas com anticorpos anti-CD80 FITC (eixo x) e adquiridas em citômetro de fluxo. As análises dos marcadores foram realizadas separadamente para população 1 e população 2, conforme descrito no item 5.1. Estes resultados são representativos de três experimentos independentes.

5.2.5 – Expressão de moléculas características de plasmócitos

A presença na superfície celular de moléculas de CD138 e CD38, conjuntamente com CD45B220 indica o fenótipo de plasmócito (FALCÃO & DALMAZZO, 2007). Além disso, a expressão do receptor CXCR4 (CD184) esta associada a migração deste tipo celular para medula óssea e áreas inflamadas (TARLINTON, 2008). Células neoplásicas podem perder marcadores específicos de sua linhagem. Dessa forma, a fim de avaliar se as linhagens de plasmocitomas murinos e de hibridomas mantinham a expressão de moléculas relacionadas ao fenótipo de plasmócito, foram realizadas marcações celulares com os anticorpos anti-CD38, anti-CD138, anti-CD184 e anti-CD45/B220, sendo os resultados analisados conjuntamente.

A molécula CD138 foi expressa em todas as linhagens avaliadas, sendo o marcador que apresentou expressão mais significativa dentre as linhagens de plasmocitoma murino P3X63Ag8.653, SP2/0-Ag14 e NS1 (Fig. 13).

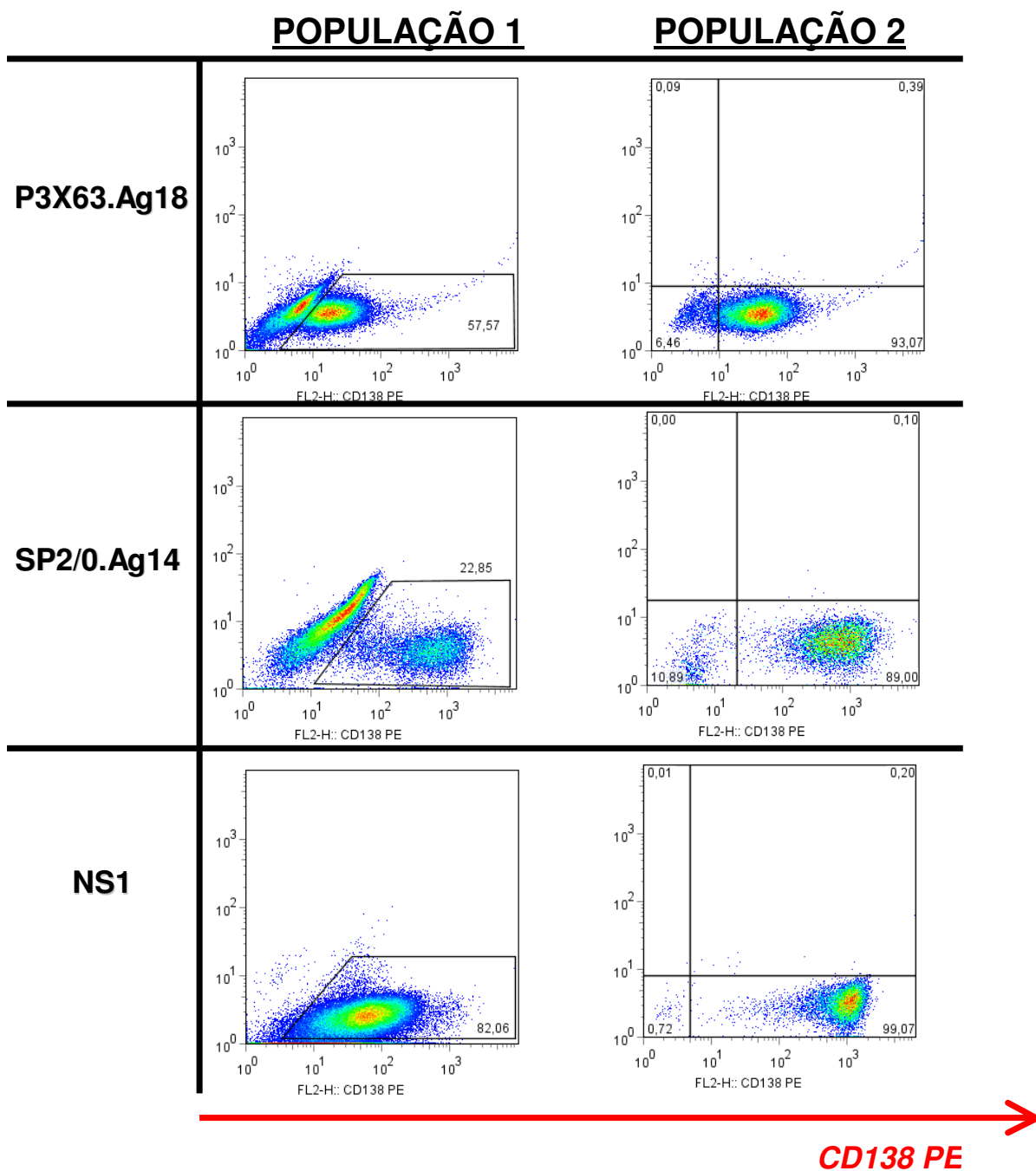


Fig. 13: Avaliação da expressão de marcadores de plasmócitos nos plasmocitomas murinos analisados. Células das linhagens P3X63Aq8.653, SP2/0-Aq14 e NS1 foram marcadas com anticorpo anti-CD138 PE (eixo x) e adquiridas em citômetro de fluxo. As análises dos marcadores foram realizadas separadamente para população 1 e população 2, conforme descrito no item 5.1. Estes resultados são representativos de três experimentos independentes.

Diferentemente de CD138, o marcador CD38 esteve presente apenas na linhagem celular NS1 (Fig 14).

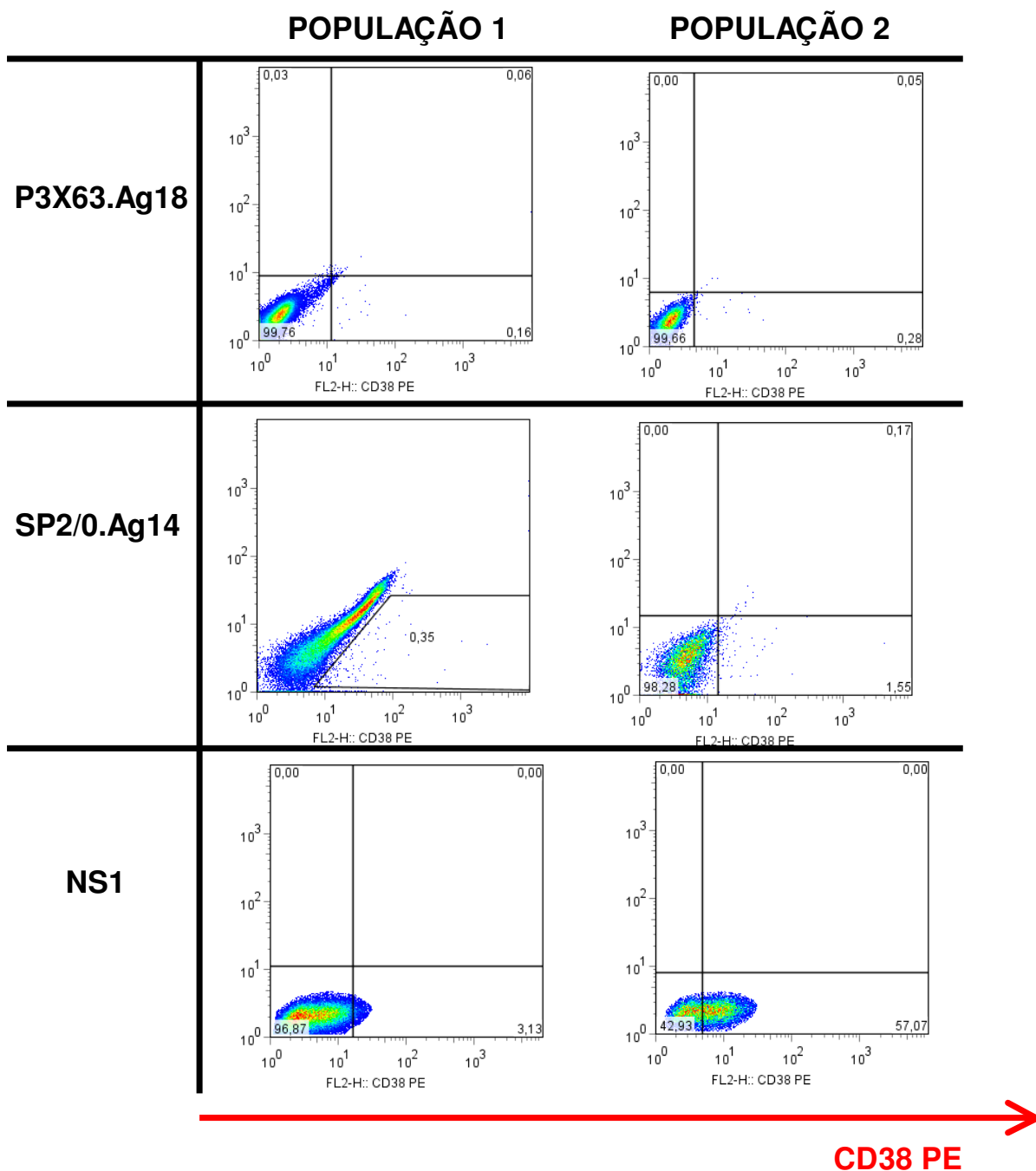


Fig. 14: Avaliação da expressão de marcadores de plasmócitos nos plasmocitomas murinos analisados. Células das linhagens P3X63Ag8.653, SP2/0-Ag14 e NS1 foram marcadas com anticorpo anti-CD38 PE (eixo x) e adquiridas em citômetro de fluxo. As análises dos marcadores foram realizadas separadamente para população 1 e população 2, conforme descrito no item 5.1. Estes resultados são representativos de três experimentos independentes.

A molécula CD184 está presente em todas as linhagens celulares avaliadas, sendo expressa tanto nas subpopulações 1 como nas subpopulações 2. Em contrapartida, o marcador CD45/B220 apresentou uma expressão restrita às subpopulações 1 das linhagens P3X63Ag8.653 e SP2/0-Ag14. Na linhagem NS1 a molécula CD45B/220 esteve presente em ambas subpopulações, mas ocorreu em maior número de células marcadas na subpopulação 2 (Fig. 15).

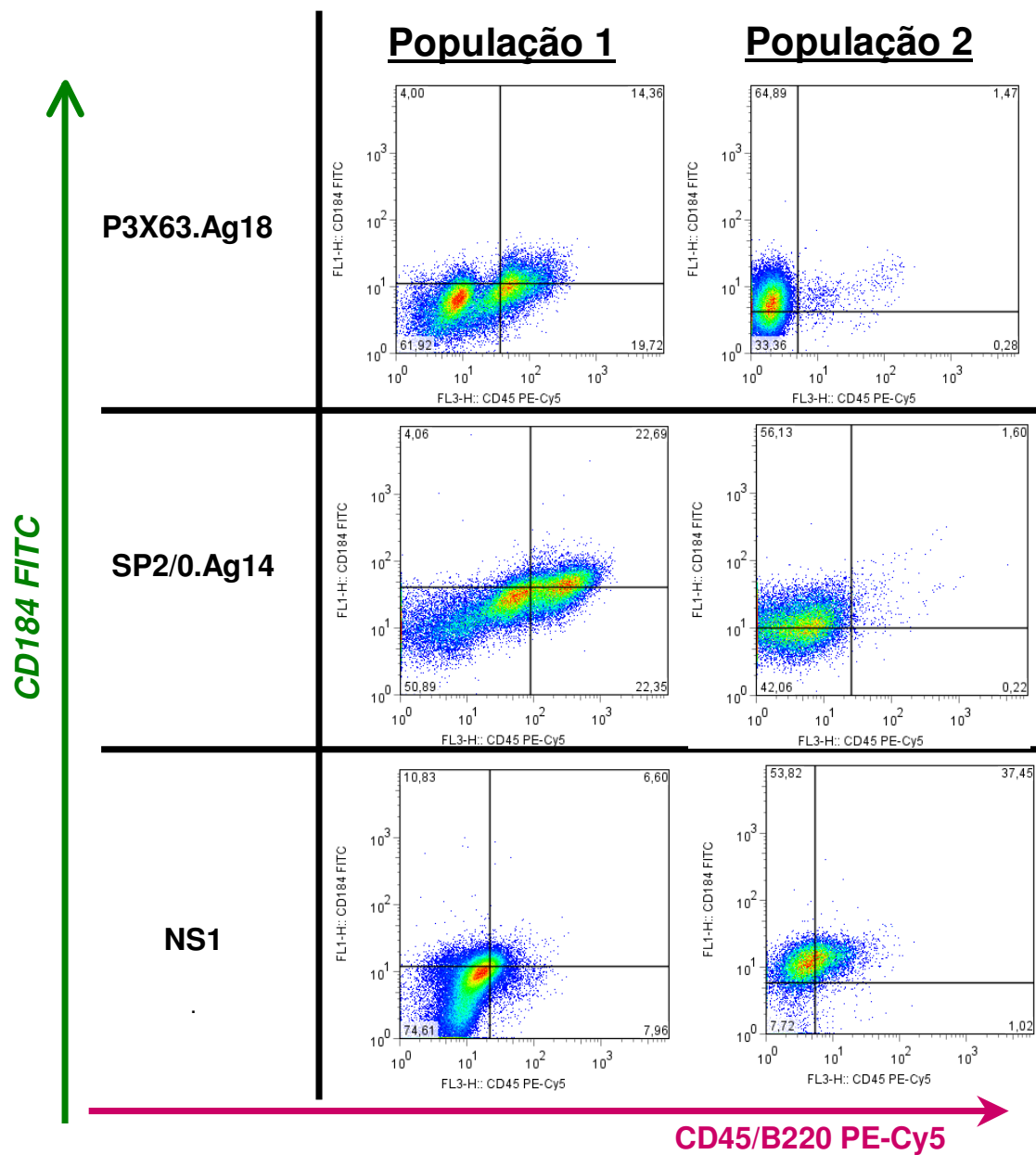


Fig. 15: Avaliação da expressão de marcadores de plasmócitos nos plasmocitomas murinos analisados. Células das linhagens P3X63Ag8.653, SP2/0-Ag14 e NS1 foram marcadas com anticorpos anti-CD184 FITC (eixo y) e anti-CD45/B220 PerCP-Cy5.5 (eixo x) e adquiridas em citômetro de fluxo. As análises dos marcadores foram realizadas separadamente para população 1 e população 2, conforme descrito no item 5.1. Estes resultados são representativos de três experimentos independentes.

5.3 Imunofenotipagem dos hibridomas 46C e 9C7

A fim de determinar o perfil imunofenotípico dos hibridomas 46C e 9C7 foram realizadas marcações celulares com anticorpos dirigidos a diferentes antígenos de superfície celular seguida de aquisição em citômetro de fluxo. Os resultados serão apresentados de acordo com os mesmos grupos de anticorpos utilizados para a imunofenotipagem das linhagens de plasmocitoma murino (vide item 5.2).

Dentre as moléculas classificadas como acessórias de ativação do BCR (CD19, CD21.35 e CD79b) o marcador CD21.35 foi encontrado unicamente na população 1 do hibridoma 46C, enquanto que a molécula CD79b foi expressa por ambos, com maior porcentagem de células positivas na população 1. As moléculas acessórias de regulação do BCR, CD22 e CD72 foram expressas de modo heterogêneo pelos dois hibridomas avaliados. O hibridoma 46C apresentou a molécula CD22 apenas na população 2 e a molécula CD72 em ambas populações. Por outro lado, o hibridoma 9C7 expressou CD72 apenas na população 1 e a molécula CD22 em ambas populações. A expressão dos marcadores de ativação se deu de modo oposto entre os hibridomas avaliados. Enquanto o hibridoma 46C expressou a molécula CD25 em ambas populações e CD69 apenas na população 2 o hibridoma 9C7 expressou a molécula CD69 em ambas subpopulações e a molécula CD25 apenas na população 1. Ambos os hibridomas avaliados expressaram moléculas co-estimulatórias de interação com linfócito T. Sendo que, tanto CD40 quanto CD80 foram expressos nas duas subpopulações de ambos hibridomas. Todas as moléculas características de plasmócito (CD138, CD38, CD45/B220 e CD184) foram expressas por ambas as populações dos hibridomas 46C e 9C7, sendo CD38 o marcador mais significativo.

Na Tabela 6 pode ser observada a intensidade média de fluorescência dos marcadores utilizados nesse trabalho para os hibridomas 46C e 9C7. Para fins comparativos, o perfil de expressão das linhagens de plasmocitoma murino avaliadas também está representado.

Tabela 6: Marcadores celulares avaliados nas três linhagens de plasmocitoma murinos e nos dois hibridomas avaliados.

Grupos	Moléculas	P3X63Ag8	SP2\0Ag14	NS1	46C	9C7
<i>Acessórias do Complexo BCR (ativação)</i>	CD79b	-	+	+	++	+
	CD21/35	-	-	-	+	-
	CD19	-	-	+	-	-
<i>Acessórias do Complexo BCR (regulação)</i>	CD22.2	-	+	+	+	++
	CD72	-	++	+	++	+
<i>Ativação celular</i>	CD25	+	++	+	+++	++
	CD69	-	-	+	+	+++
<i>Interação com linfócito T</i>	CD40	++	+	-	+	++
	CD80	+	++	++	++++	++
<i>Fenótipo de plasmócitos</i>	CD184	++	++++	+++	++++	++
	CD138	+++++	++++	+++++	++++	++++
	CD38	-	-	++	+++++	++++
	CD45B/220	++	++++	+++	+++	++

6 – Discussão

Mesmo frente a seu sucesso e sua ampla aplicação, o processo de produção de anticorpos monoclonais é extremamente laborioso e de alto custo (PRICE *et al.*, 2009). Tendo essa questão em vista, diferentes grupos de pesquisa tem trabalhado em propostas de modificações e otimização da técnica elaborada por Khöler & Milsten. Para tal, tem sido utilizados, por exemplo, ferramentas de biologia molecular (WATKINS & OUWEHAND, 2000; PRICE *et al.*, 2009), esplenócitos imortalizados (PASQUALINI & ARAP, 2004), células de ovário de hamster chinês (BIRCH & RACHER, 2006) e monitoramento por fluorometria (SZMACINSKI *et al.*, 2008). Ainda assim, as linhagens P3X63Ag8.653, SP2/0-Ag14 e NS1 seguem sendo amplamente utilizadas para a obtenção de hibridomas produtores de anticorpos monoclonais. Perante sua importância, a exploração de diferentes características destas células poderia ser uma estratégia interessante na busca por um processo de produção de anticorpos monoclonais mais eficiente. Entretanto, após o estabelecimento destas linhagens celulares foram realizados poucos estudos, sendo limitada a quantidade de informação a respeito destas células. Dessa forma, neste trabalho buscou-se, através do estudo em citômetro de fluxo, aumentar o conhecimento sobre a biologia das linhagens celulares de plasmocitoma murino utilizadas na produção de anticorpos monoclonais a fim de possivelmente fornecer subsídios para o desenvolvimento de novos protocolos de otimização deste processo.

Por meio da citometria de fluxo foi possível determinar o tamanho e complexidade celular das células analisadas. Em todas as linhagens celulares avaliadas neste estudo foi observada claramente a presença de duas subpopulações distintas quanto ao tamanho celular. Dentre os fenômenos que podem influenciar o tamanho celular é possível citar a atividade biossintética e o próprio crescimento da célula, que inferem em um aumento de tamanho, bem como as diferentes fases do ciclo celular. Além disso, o tamanho do genoma também pode influenciar fortemente o tamanho celular. Quanto maior a poliploidia, maior o aumento da massa celular (SAUCEDO & EDGAR, 2002). Segundo Jorgensen & Tyers (2004) o tamanho é um atributo fundamental relacionado à caracterização celular e adequação da função de determinado tipo de célula. Mesmo para células em constante crescimento e divisão, geralmente acontece uma típica e limitada variação de tamanho ao longo de gerações sucessivas. Assim, é comum a observação de um perfil com distribuições de tamanho características para células em alta proliferação.

Considerando os aspectos mencionados, acredita-se que as variações apresentadas pelas linhagens estudadas estejam relacionadas a diferentes estágios do ciclo celular e/ou fases distintas de crescimento celular. Experimentos preliminares (dados não mostrados) sugerem que uma maior quantidade de células das subpopulações 1 tem viabilidade celular diminuída em comparação com as da subpopulação 2. Nos últimos estágios de apoptose as células em cultura perdem a integridade de suas membranas (ORMEROD, 2002). Sendo assim, o próprio perfil de grande autofluorescência celular da população 1 corrobora essa hipótese, uma vez que células

com a integridade da membrana plasmática comprometida apresentam padrões de fluorescência alterados (BAUMGARTH & ROEDERER, 2000). Acredita-se que essa perda de viabilidade indica maior senescência celular da população 1.

Entretanto células viáveis foram observadas em ambas subpopulações das linhagens celulares avaliadas (dados não mostrados). Considerando-se que tratam-se de células neoplásicas (mantém altos níveis de proliferação) é possível sugerir também que estas células se encontram em estágios diferentes de ciclo celular. Efeitos de crescimento são vistos tanto em células mitóticas como pós-mitóticas, mas o aumento de tamanho geralmente é mais pronunciado quando as células se tornam pós-mitóticas (SAUCEDO & EDGAR, 2002). Dessa forma, sugere-se que as células viáveis da população 1 encontram-se em um estado mitótico enquanto a população 2 em um estado pós-mitótico.

É importante se considerar que a dinâmica de cada linhagem celular é diferente. A manutenção do tamanho das células envolve a homeostase entre a síntese e degradação de macromoléculas. Diferentes condições de cultura a saturação de nutrientes e de fatores de crescimento podem influenciar o tamanho e a integridade celular (SAUCEDO & EDGAR, 2002), assim como também pode alterar o equilíbrio entre células da população que entram naturalmente em apoptose e células que entram abruptamente em processo de necrose. Desse modo, para se inferir maiores conclusões a respeito da possível diferença na viabilidade das células das subpopulações avaliadas são necessários estudos adicionais que envolvam diferentes suplementações no meio de cultura e diferentes tempos de cultivo (cinética celular), assim como o uso de diferentes marcadores de viabilidade celular, apoptose e ciclo celular.

Além dos padrões de tamanho e complexidade interna, também foi realizada a imunofenotipagem de cada linhagem celular. O painel de anticorpos utilizado nesse trabalho foi escolhido com base em moléculas expressas preferencialmente em linfócitos B e no perfil imunofenotípico de células de mieloma múltiplo humano. A intenção dessa estratégia foi possibilitar a comparação do perfil de expressão das células das linhagens de plasmocitoma murino com o perfil de linfócitos B normais e linfócitos B neoplásicos.

Nenhuma das linhagens de plasmocitoma murino avaliadas tem capacidade de secretar imunoglobulinas. Enquanto as linhagens P3X63Ag8.653 e SP2/0-Ag14 são incapazes de sintetizar tanto cadeias pesadas, como cadeias leves, a linhagem NS1 tem capacidade de síntese apenas da cadeia leve (YOO *et al.*, 2002). A ausência de síntese de imunoglobulinas destas linhagens celulares condiciona também a não expressão do BCR. O complexo BCR é o receptor de antígenos da célula B. Trata-se de uma imunoglobulina de membrana que tem sua ação modulada por uma série de proteínas co-ligantes, características da linhagem B (KUROSAKI, 2000).

Dentre as moléculas acessórias de ativação do BCR foram avaliadas no presente estudo CD19, CD21.35 e CD79b. As moléculas CD19 e CD21.35 formam um complexo e atuam sinergicamente, enquanto que CD79b atua em conjunto com CD79a sendo fundamental para ativação de linfócitos B (TUCKER & LEBIEN, 2008). Frente à ausência do complexo BCR nas linhagens celulares avaliadas, não se esperava observar a ocorrência das proteínas co-ligantes relacionadas a sua ativação. Entretanto, a molécula CD79b foi expressa nas linhagens SP2/0-Ag14 e NS1, não sendo encontrada apenas na linhagem P3X63Ag8.653. A ausência de expressão de CD79b reforça o caráter não secretor desta linhagem celular, uma vez que trata-se de uma molécula necessária para a expressão do BCR e portanto para ativação celular (SHULZHENKO *et al.*, 2009).

A ausência de CD19 ocorreu tanto na linhagem P3X63Ag8.653 como na linhagem SP2/0-Ag14. Esse resultado está de acordo com o apresentado por outros pesquisadores, uma vez que segundo Falcão *et al.* (2007), a molécula CD19 apesar de ser encontrado em plasmócitos normais não é expresso na maioria das células de mieloma. Estudos com camundongos deficientes na produção de CD19 indicam que a ausência desta molécula interfere na maturação dos linfócitos B na medula óssea e na geração de plasmócitos (ENGEL *et al.*, 1995; SATO *et al.*, 1997). Em um estudo recente Diamant *et al.* (2005) avaliaram a ausência de CD19 em linfócitos B de camundongos, mostrando que a perda de CD19 implicava também numa perda da maturação de células B. Porém, demonstraram que células B imaturas CD19⁻ foram capazes de secretar anticorpos quando estimuladas com LPS.

As linhagens de plasmocitoma murinos avaliadas neste trabalho não são capazes de secretar anticorpos. Contudo, são derivadas de um plasmocitoma secretor (Fig. 3) do qual foram isoladas células iniciais, que passaram por vários processos de seleção a fim de perder a capacidade secretora. Inicialmente poderia se especular que estas linhagens celulares perderam o complexo CD19/CD21.35 durante esse processo de seleção. Entretanto a existência de linfócitos B CD19⁻ com capacidade secretora, pode sugerir que desde as células progenitoras destas linhagens não havia expressão de CD19.

Assim como existem moléculas responsáveis pela ativação do BCR, sua regulação é muito importante a fim de evitar uma super estimulação das células B. Sendo assim, células B normais expressam co-receptores responsáveis pela modulação negativa do sinal do BCR, dentre os quais estão CD22 e CD72 (NITSCHKE, 2005; WALKER & SMITH, 2007; WU & BONDADA, 2007). Nas linhagens celulares estudadas observou-se um padrão de expressão conjunta destes marcadores. Em todas as linhagens celulares avaliadas, ambos estiveram presentes ou ausentes, não ocorrendo a expressão isolada de apenas CD22 ou CD72. Isso poderia indicar uma co-relação entre a expressão destes dois marcadores, entretanto não se encontrou dados na literatura que corroborassem essa hipótese.

A linhagem celular P3X63Ag8.653 não apresentou expressão de CD22 nem CD72, caracterizando-se por não apresentar em sua superfície nenhuma das moléculas co-receptoras (de ativação e regulação) relacionadas ao BCR, como esperado para uma célula que não é capaz de sintetizar o próprio BCR. Por outro lado, a linhagem SP2/0-Ag14 expressa tanto CD22 como CD72, sendo este último em alta porcentagem. Esse resultado é discordante dos apresentados por Wu & Bondada (2002), que afirmam que CD72 não é expresso por plasmócitos.

A molécula de adesão CD138, responsável pela ancoragem dos plasmócitos na medula óssea, e a molécula CD184, receptor de quimiocina relacionado à migração celular (NIE *et al.*, 2004) são típicos marcadores do fenótipo de plasmócitos (CULTON *et al.*, 2006). A expressão de ambas foi mais significativa e homogênea entre as subpopulações de cada linhagem avaliada, corroborando estes dados. Somado a este resultado, as linhagens celulares P3X63Ag8.653 e SP2/0-Ag14 apresentaram ausência de expressão de CD19 e baixa expressão de CD45/B220 (limitada a subpopulação 1), indicando um fenótipo similar ao encontrado nos relatos de imunofenotipagem para células de mieloma múltiplo humano (FALCÃO *et al.*, 2007). A linhagem NS1 apresentou um perfil diferente com relação a esses marcadores, uma vez que apresentou a expressão de CD19 (limitada a subpopulação 2).

Outro marcador utilizado como característico de plasmócito e com expressão significativa em células de mieloma humano é a molécula CD38 (PÉREZ-ANDRÉS *et al.*, 2005). Ao contrário dos demais marcadores de mieloma humano, CD38 não foi expresso nas linhagens celulares P3X63Ag8.653 e SP2/0-Ag14. Segundo Lund *et al.* (1995), a molécula CD38, diferente do que ocorre em humanos, é regulada negativamente em plasmócitos murinos. Este dado poderia explicar a ausência de CD38 nas células de P3X63Ag8.653 e SP2/0-Ag14, entretanto a expressão deste marcador na linhagem NS1 indica que sua presença também pode ser encontrada em plasmócitos murinos alterados.

Pérez-Andrés *et al.* (2005), publicaram um estudo comparando o perfil imunofenotípico de diferentes neoplasias de célula B madura humana com plasmócitos normais. Dentre os marcadores avaliados por esse grupo estavam CD40 e CD80, que são moléculas co-estimulatórias de interação entre linfócito B e linfócito T que podem estar envolvidas na progressão de mieloma múltiplo, assim como indicar uma resposta imune alterada. Seus resultados indicaram que CD40 teve uma maior expressão em plasmócitos normais comparativamente a plasmócitos neoplásicos. Em contrapartida, a molécula CD80 não foi expressa tanto nos plasmócitos normais como nos plasmócitos clonais avaliados.

Os resultados encontrados no presente trabalho indicam uma discordância na expressão de moléculas co-estimulatórias de linfócito T entre plasmócitos humanos alterados (PÉREZ-ANDRÉS *et al.*, 2005) e as linhagens de plasmocitoma murino P3X63Ag8.653, SP2/0-Ag14 e NS1. Todas as linhagens de plasmocitoma avaliadas neste trabalho apresentaram, mesmo que

em diferentes proporções, expressão de CD80. Por outro lado, a expressão de CD40 ocorreu tanto na linhagem SP2/0-Ag14 como em P3X63Ag8.653, sendo nesta em alta porcentagem de células. Uma possível explicação para a expressão de CD80 nas linhagens celulares avaliadas pode ser encontrada no trabalho de Suvas *et al.* (2002) que indica a presença de CD80 como um sinal negativo para a secreção de IgG em linfócitos B normais e células de linfomas murinos.

A ausência ou baixa expressão de CD117 é indicada por Fumari *et al.* (2005) também como uma característica de células mielomatosas humanas. As linhagens celulares avaliadas neste estudo não apresentaram expressão deste marcador. Dessa forma, foi possível observar a existência de similaridade entre os fenótipos de plasmócitos alterados humanos e das linhagens de plasmocitomas murinos avaliadas, em relação a este marcador. Entretanto, para avaliar melhor esta similaridade é necessária também a avaliação da expressão de outros marcadores utilizados para a caracterização de mielomas humanos como CD56, HLA-DR e cadeias *kappa* e *lambda* de superfície e intracitoplasmáticas.

Muitos trabalhos utilizam as proteínas CD25 e CD69 como marcadores de ativação celular (SHEN & WU, 2008), entretanto essas moléculas agem de diferentes maneiras na célula. A molécula CD69 é um antígeno de diferenciação expresso rapidamente após ativação em diversas células de origem hematopoiéticas incluindo células NK, linfócitos B e T (ZIEGLERA *et al.*, 1994). Por outro lado, a molécula CD25 consiste na subunidade α do receptor da interleucina 2 (IL-2) e aumento de sua expressão é induzido através da produção desta citocina (AMU *et al.*, 2007).

Por se tratar de um marcador de ativação precoce, não era esperada a presença de CD69 nas linhagens de plasmocitoma murino. Essa hipótese foi verdadeira para as linhagens P3X63Ag8.653 e SP2/0-Ag14, que não apresentaram expressão de CD69. Entretanto, a linhagem NS1 apresentou expressão desta molécula principalmente na subpopulação 2. Essa diferença pode se dar pelo fato de que NS1 é uma linhagem que não perdeu totalmente a capacidade secretora, sendo capaz de secretar cadeias leves de imunoglobulina (BARNES *et al.*, 2000).

Por outro lado, todas as linhagens celulares avaliadas neste trabalho expressaram em uma alta porcentagem de suas células o marcador CD25. Amu *et al.* (2007) avaliaram a presença de CD25 em linfócitos B humanos, demonstrando que o fenótipo CD25⁺ está associado a células mais maduras e ativadas, com maior capacidade de apresentação de antígeno e síntese de imunoglobulina de superfície, mas com capacidade diminuída de secreção das mesmas, quando comparadas as células de fenótipo CD25⁻. Observando-se o padrão de expressão de CD25 nas linhagens celulares de plasmocitoma nota-se que a subpopulação 1 de todas as linhagens apresenta maior porcentagem de células positivas para esse marcador. Considerando-se os estudos citados, as células da população 1 poderiam apresentar um fenótipo de maior ativação que talvez se relacione com uma fase de proliferação do ciclo celular. Entretanto para tal

inferência são necessários novos experimentos a fim de avaliar diferenças entre os agrupamentos celulares que apresentam picos de tamanho diferentes observados em cada linhagem.

De maneira geral, as linhagens P3X63Ag8.653 e SP2/0-Ag14 apresentaram uma maior similaridade entre os marcadores expressos. Esses resultados eram esperados, uma vez que SP2/0-Ag14 é derivada de P3X63Ag8.653 (Fig. 3). A diferença encontrada entre as linhagens P3X63Ag8.653 e SP2/0-Ag14 foi a expressão de CD79b, CD22 e CD72 apenas na linhagem SP2/0-Ag14. Esta linhagem foi originada a partir da fusão da linhagem P3X63Ag8.653 com células do baço de camundongo imunizado (SHULMAN *et al.*, 1978), fato que pode explicar o maior número de moléculas características de célula B expressas na linhagem SP2/0-Ag14 em comparação a linhagem P3X63Ag8.653. A linhagem celular NS1, apesar de derivar do mesmo grupo de células que deram origem também a P3X63Ag8.653 e SP2/0-Ag14, foi estabelecida de maneira independente de ambas (Fig. 3). Essa diferença em sua origem pode explicar porque a linhagem celular NS1 apresentou maior heterogeneidade de seus marcadores de superfície em comparação com as duas outras linhagens de plasmocitoma analisadas.

Após a realização da imunofenotipagem das linhagens de plasmocitoma murino foi realizada também a determinação do perfil imunofenotípico de dois hibridomas denominados 46C e 9C7. O intuito deste procedimento foi comparar os marcadores expressos entre os plasmocitomas e os hibridomas, buscando entender quais são as alterações ocorridas nas células após o processo de fusão.

O perfil imunofenotípico apresentado pelos hibridomas avaliados foi bastante semelhante entre si e em comparação com as linhagens de plasmocitoma murino. Tanto o hibridoma 46C como o 9C7 foram estabelecidos a partir de fusões realizadas com a linhagem P3X63Ag8.653, dessa forma era esperado que seu perfil se assemelhasse muito ao dessa linhagem. As maiores diferenças encontradas foram a expressão de CD69 e CD38 nas linhagens de hibridomas. Considerando que os hibridomas utilizados foram provenientes de processo pode-se concluir que essas moléculas são originadas dos plasmócitos oriundos do baço do camundongo, indicando a presença das mesmas nas células B ativadas do animal. A presença de CD69 não era esperada, uma vez que se trata de uma molécula de expressão rápida após ativação (ZIEGLERA, *et al.*, 1994). Entretanto, a grande capacidade de secreção de anticorpos destas células, pode implicar um constante estado de ativação destas células, que explicaria a expressão deste marcador. Em contrapartida, a molécula CD38 é um importante co-estimulador do BCR capaz de influenciar a ativação de plasmócitos (LUND, 2006), o que justifica sua presença em células de hibridomas secretores de anticorpos monoclonais. A expressão da molécula CD38 nos hibridomas (células com alta capacidade secretora) e sua ausência na linhagem P3X63Ag8.653 (célula não secretora), reforça a hipótese de seu importante papel na estimulação dos linfócitos B.

Os resultados obtidos no presente trabalho contribuem para melhor compreensão das linhagens celulares P3X63Ag8.653, SP2/0-Ag14 e NS1. A partir do conhecimento da expressão de marcadores específicos destas células *in vitro*, abrem-se novas possibilidades de estudo de sua biologia. Dada a expressão heterogênea dos marcadores, futuros estudos comparativos de fusão, utilizando cada subpopulação isoladamente, poderão otimizar o processo de produção de anticorpos monoclonais.

7. Conclusões

Após o estabelecimento dos valores de detecção de citometria de fluxo e a padronização dos protocolos de marcação celular para as linhagens P3X63Ag8.653, SP2/0-Ag14 e NS1 foi possível realizar a imunofenotipagem de cada uma dessas linhagens celulares. Apesar da sua origem e função em comum, os parâmetros de tamanho e complexidade interna, assim como o perfil imunofenotípico se mostraram característicos de cada linhagem celular. Com base nesse perfil é possível distinguir o fenótipo específico de P3X63Ag8.653, SP2/0-Ag14 e NS1, sendo estabelecida com sucesso sua caracterização.

O mesmo procedimento foi realizado para as linhagens de hibridomas 46C e 9C7, possibilitando também o estabelecimento do perfil imunofenotípico de cada hibridoma e permitindo uma comparação deste com o expresso pelas linhagens de plasmocitoma murino avaliadas. O padrão de expressão dos hibridomas avaliados e de seu plasmocitoma de origem (P3X63Ag8.653) foi bastante semelhante. A diferença mais significativa observada foi a alta expressão da molécula CD38 em ambos os hibridomas avaliados. Caso esse padrão seja confirmado em estudos mais amplos com diferentes hibridomas, o marcador CD38 poderia ser utilizado para monitoramento celular em processos de produção de anticorpos monoclonais durante os primeiros estágios após a fusão.

8. Referências

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; SHIV, P. **Imunologia Celular e Molecular**, 6 ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.
- ADETUGBO, K.; MILSTEIN C.; SECHER D. S. Molecular analysis of spontaneous somatic mutants. **Nature**, v. 27, p.299-304, 1977.
- AMU, S.; *et al.* The human immunomodulatory CD25+ B cell population belongs to the memory B cell pool. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 66, p. 77–86, 2007.
- BARNES, L. M.; BENTLEY, C. M.; DICKSON, A. J. Advances in animal cell recombinant protein production: GS-NSO expression system. **Cytotechnology**, v. 32, p.109-123, 2000.
- BARROS, T. F.; SIMONI, I.C.; FERNANDES, M. J. B. Análise eletroforética de isoenzimas para detecção de contaminação cruzada entre linhagens celulares. **Revista Biociências**, v.14, p.17-22, 2008.
- BARTHOLDY, B.; MATTHIAS, P. Transcriptional control of B cell development and function. **Gene**, v.327, p.1-23, 2004.
- BAUMGARTH, N.; ROEDERER, M. A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping. **Journal of Immunological Methods**, v.243, p77-97, 2000.
- BERGSAGEL, P.; KUEHL, M. Molecular pathogenesis and a consequent classification of multiple myeloma. **Journal of Clinical Oncology**, v.23, p. 6333-6338, 2005.
- BIRCH, J. R.; RACHER, A. J. Antibody production. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.58, p.671-85, 2006.
- BLOM, B. & SPITS, H. Development of human lymphoid cells. **Annual Review Immunology**, v.24, p.287–320, 2006.
- BRUIN, P.; *et al.* CD30 expression in normal and neoplastic lymphoid tissue: biological aspects and clinical implications. **Leukemia**, v. 10, p.1620-1627, 1995.
- BURMESTER, G. R.; PEZZUTO, A. **Color Atlas of Immunology**. New York, EUA: Thieme Stuttgart, 2003.
- CASOLA, S. Control of peripheral B-cell development. **Current Opinion in Immunology**, v.19, p.143-9, 2007.
- CHEN, Z.; KORALOV, B.; KELSOE, G. Regulation of humoral immune responses by CD21/CD35. **Immunological Reviews**, v. 176, p.194-204, 2000.
- CULTON, D.; *et al.* Early preplasma cells define a tolerance checkpoint for autoreactive B cells. **Journal of Immunology**, v. 176, p. 790–802, 2006.
- DIAMANT, E.; KEREN, Z; MELAMED, D. CD19 regulates positive selection and maturation in B lymphopoiesis: lack of CD19 imposes developmental arrest of immature B cells and consequential stimulation of receptor editing. **Blood**, v. 8, p.194-204, 2005.
- DURIE, B. G. Do mieloma e das opções de tratamento. **International Myeloma Foundation**, v. 1, p. 1–30, 2006.

ENGEL P.; *et al.* Abnormal B lymphocyte development, activation, and differentiation in mice that lack or overexpress the CD19 signal transduction molecule. **Immunity**, v. 3, p. 39-50, 1995.

FALCÃO, R. FELIPE, L.; DALMAZZO, F. The value of immunofenotyping for the diagnosis of Multiple Myeloma and for the evaluation of minimal residual disease. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, p.75-83, 2007.

FRESHNEY, R. I. **Culture of Animal Cells: a Manual of Basic Technique**, 5 ed., Glasgow, UK: John Wiley and Sons, 2005.

FUMARI, M.; *et al.* Multiple Myeloma: 50 cases diagnosed by flow cytometry. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 27, p. 31-36, 2005.

GAUTHIER, E. R.; PICHÉ, L.; LEMIEUX, G.; LEMIEUX, R. Role of bcl-X(L) in the control of apoptosis in murine myeloma cells. **Cancer Research**, v.15, p.1451-6, 1996.

HARDY, R. R.; KINCADE, P. W.; DORSHKIND, K. The protean nature of cells in the B lymphocyte lineage. **Immunity**, v.26, p.703-714, 2007.

HORIBATA, K.; HARRIS, A. W. Mouse myelomas and lymphomas in culture. **Experimental Cell Research**, v. 60, p.61-77, 1970.

JANEWAY, C.; TRAVERS P.; WALPORT M.; SHLOMCHIK M. J. **Immunobiology: the immune system in health and disease**. 6 ed. New York: Garland Science, 2005.

JORGENSEN, P.; TYERS, M. How cells coordinate growth and division. **Current Biology**, v. 14, p. 1014-1017, 2004.

KALEEM, Z. Flow cytometric analysis of lymphomas: current status and usefulness. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v.130, p.1850-8, 2006.

KARASUYAMA, H.; MELCHERS, F. Establishment of mouse cell lines which constitutively secrete large quantities of interleukin 2, 3, 4 or 5, using modified cDNA expression vectors. **European Journal of Immunology**, v.18, p.97-104, 1988.

KEARNEY, J. F.; RADBRUCH, A.; LIESEGANG, B.; RAJEWSKY, K. A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines. **Journal of Immunology**, v.123, p.1548– 1550, 1979.

KOHLER, G; MILSTEIN, C. Continuous culture of fused cell secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, v. 256, p.495-497, 1975.

KUCHEN, S.; ROBBINS, R.; SIMS, P. Essential role of IL-21 in B cell activation, expansion, and plasma cell generation during CD4 T cell-B cell collaboration. **Journal of Immunology**, v. 179, p.5886-5896, 2007.

KUROSAKI, T. Functional dissection of BCR signaling pathways. **Current Opinion in Immunology**, v. 12, p. 276–281, 2000.

LAI, L.; *et al.* Mouse Cell Surface Antigens: Nomenclature and Immunophenotyping. **The American Association of Immunologists**, v.22, p. 1767–98, 1998.

LELAND D. S.; GINOCCHIO C. C. Role of cell culture for virus detection in the age of technology. **Clinical Microbiology Review**, v.20, p.49-78, 2007.

LUND, F. Signaling Properties of CD38 in the Mouse Immune System: Enzyme-dependent and -

independent Roles in Immunity. **Molecular Medicine**, v. 12, p. 328-333, 2006.

LYNCH, R.; *et al*. Immunoregulation of murine myeloma cell growth and differentiation: a monoclonal model of B cell differentiation. **Immunological Reviews**, v.48, p.45-80, 1979.

MITSUTAKE, N.; *et al*. Characterization of side population in thyroid cancer cell lines: cancer stem-like cells are enriched partly but not exclusively. **Endocrinology**, v.148, p.1797–1803, 2006.

NACIONAL ACADEMY PRESS. **Monoclonal Antibody Production. Committee on Methods of Producing for Laboratory Animal Research**, National Research Council, Washington, DC, 1999. Disponível em: <<http://www.nap.edu/catalog/9450.html>> Acesso em: junho de 2009.

NIE, Y.; *et al*. The Role of CXCR4 in Maintaining Peripheral B Cell Compartments and Humoral Immunity. **Journal Experimental Medicine**, v. 200, p. 1145–1156, 2004.

NITSCHKE, L ; TSUBATA, T. Molecular interactions regulate BCR signal inhibition by CD22 and CD72. **Trends in Immunology**, v. 25, p. 154-162, 2004.

NITSCHKE, L. The role of CD22 and other inhibitory co-receptors in B-cell activation. **Current Opinion in Immunology**, v. 17, p. 290–297, 2005.

ORMEROD, M. Investigating the relationship between the cell cycle and apoptosis using flow cytometry. **Journal of Immunological Methods**, v. 265, p. 73-80, 2002.

PASQUALINI, R.; ARAP, W. Hybridoma-free generation of monoclonal antibodies. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, p. 257-259, 2004.

PEREZ-ANDRES, M.; *et al*. Clonal plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance, multiple myeloma and plasma cell leukemia show different expression profiles of molecules involved in the interaction with the immunological bone marrow microenvironment. **Leukemia**, v. 19, p. 449–455, 2005.

PETRICCIANI, J.; SHEETS, R. An overview of animal cell substrates for biological products. **Biologicals**, v.36, p.359-62, 2008.

PHELAN, M. C. Techniques for mammalian cell tissue culture. **Current Protocol in Neuroscience**, Appendix 3B, 2007. Disponível em: < <http://www.currentprotocols.com/protocol/nsa03b>>.

POTTER, M.; BOYCE, C. Induction of plasma cell neoplasms in strain balb/c mice with mineral oil and mineral oil adjuvants. **Nature**, v.222, p.086–1087, 1962.

PRESTWICH, G. D. Evaluating drug efficacy and toxicology in three dimensions: using synthetic extracellular matrices in drug discovery. **Accounts of Chemical Research**, v.41, p.139-48, 2008.

PRICE, P.; *et al*. Engineered cell surface expression of membrane immunoglobulin as a means to identify monoclonal antibody-secreting hybridomas. **Journal of Immunological Methods**, n. 343, p.28-41, 2009.

RICARDO R.; PHELAN K. Trypsinizing and subculturing mammalian cells. **Journal of Visualized Experiments**, v.12, p.745-55, 2008.

SATO S.; *et al*. Regulation of B lymphocyte development and activation by the CD19/CD21/CD81/Leu 13 complex requires the cytoplasmic domain of CD19. **Journal of Immunology**, v. 159, p. 3278-3287, 1997.

SAUCEDO, J.; EDGAR, B. Why size matters: altering cell size. **Current Opinion in Genetics Development**, v. 12, p. 565-571, 2002.

SHEN, E.; LU, L.; WU, C. TLR7/8 ligand, R-848, inhibits IgE synthesis by acting directly on B lymphocytes. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 67, p.560-568, 2008.

SHULMAN, M.; WILDE, C.D.; KOHLER, G. A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies. **Nature**, v.276, 269– 270, 1978.

SHULZHENKO, N.; *et al.* Spontaneous mutation in the *Cd79b* gene leads to a block in B-lymphocyte development at the C' (early pre-B) stage. **Genes and Immunity advance online publication**, Set, 2009. Disponível em: <<http://www.nature.com/gene/journal/vaop/ncurrent/abs/gene200970a.html>> \l "aff1">

SILVA, L. M.; MONTES DE OCA, H.; DINIZ, C. R.; FORTES-DIAS, C. L. Fingerprinting of cell lines by directed amplification of minisatellite-region DNA (DAMD). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.34, p.1405-1410, 2001.

SIRONI, M.; *et al.* Generation and characterization of a mouse lymphatic endothelial cell line. **Cell Tissue**, v.325 p. 91–100, 2006.

STEWART, C. C.; STEWART, S. J. Clinical immunophenotyping by flow cytometry. **Medical TechNet Presentations**, p.1-13, 1995.

SUVAS, S.; *et al.* Distinct Role of CD80 and CD86 in the Regulation of the Activation of B Cell and B Cell Lymphoma. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 10, p. 7766–7775, 2002.

SZMACINSKI, H.; *et al.* A novel method for monitoring monoclonal antibody production during cell culture. **Biotechnol Bioengeny**, v. 100, p. 448–457 2008.

TARLINTON, D.; *et al.* Plasma cell differentiation and survival. **Current Opinion In Immunology**, v. 20, p.162-169, 2008.

THEML, H.; *et al.* **Color Atlas of Hematology**, 2 ed., Stuttgart, New York: Thieme, 2004.

TILLEY, S. A.; BIRSHTEIN, B. K. Unequal sister chromatid exchange: a mechanism affecting Ig gene arrangement and expression. **Journal Experimental Medical**, v.162, p.675-94, 1985.

TUCKER, W.; LEBIEN, T. F. T. B lymphocytes: how they develop and function. **Blood**, v.112, p.1570-80, 2008.

WALKER, J.; SMITH, K. CD22: an inhibitory enigma. **Immunology**, v. 123, p. 314–325, 2007.

WALLS, E. V.; KAY, J. E. Inhibition of proliferation of a murine myeloma cell line and mitogen-stimulated B lymphocytes by the antibiotic amphotericin B (Fungizone). **Immunology**, v. 47, p.115-21, 1982.

WATKINS, N. A.; OUWEHANDA, W. Introduction to antibody engineering and phage display. **Vox Sanguinis**, v. 78, p.72-79, 2000.

WU, H.; BONDADA, S. Positive and negative roles of CD72 in B cell function. **Immunological Research**, v. 25, n. p.155-166, 2002.

YOO, E. M.; CHINTALACHARUVU, K. R.; PENICHET, M. L.; MORRISON, S. L. Myeloma expression systems. **Journal of Immunological Methods** v.261, p.1 –20, 2002.

ZHAN, F.; *et al.* B cell neoplasms. **Monographs in Clinical Cytology**, v. 18, p.19-37, 2009.

ZIEGLERA, S.; *et al.* The activation antigen CD69. **Stem Cells**, v.12, p. 456-465, 1994